UNIVERSITÉ DE LAUSANNE — FACULTÉ DES SCIENCES

Recherches sur les variations des 17-oxo-stéroïdes urinaires chez la souris dans différentes conditions physiologiques et physiopathologiques

THÈSE DE DOCTORAT

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Lausanne

par

BÉCHIR KEKHIA

licencié ès sciences

IMPRIMERIE VAUDOISE
LAUSANNE
1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546816_0054

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Recherches sur les variations des 17-oxo-stéroïdes urinaires chez la souris dans différentes conditions physiologiques et physiopathologiques

UNIVERSITÉ DE LAUSANNE — FACULTÉ DES SCIENCES

Recherches sur les variations des 17-oxo-stéroïdes urinaires chez la souris dans différentes conditions physiologiques et physiopathologiques

THÈSE DE DOCTORAT

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Lausanne

par

BÉCHIR KEKHIA

licencié ès sciences

IMPRIMERIE VAUDOISE
LAUSANNE
1975

IMPRIMATUR

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de MM. le Dr Serge Neukomm, directeur de thèse, les professeurs Paul-Emile Pilet, rapporteur, et Georges Brunisholz, président du jury, le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de M. Béchir Kekhia, licencié ès sciences naturelles (diplôme d'Etat) intitulée « Recherches sur les variations des 17-oxo-stéroïdes urinaires chez la souris dans différentes conditions physiologiques et physiopathologiques ».

Lausanne, le 17 novembre 1975.

Pour le doyen de la Faculté des sciences :

Professeur Georges BRUNISHOLZ,
vice-doyen.

A mes parents
A ma femme
A mes filles
A mes amis

Je remercie sincèrement le Dr S. Neukomm, privat-docent, médecin-chef du Département de recherches expérimentales de l'Institut universitaire de médecine sociale et préventive, qui a bien voulu m'accueillir dans ses laboratoires, inspirer et diriger le présent travail.

Ses conseils, durant toute la préparation de la thèse, m'ont été d'une aide précieuse.

Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance.

Je remercie également le professeur P.-E. Pilet, directeur de l'Institut de biologie et de physiologie végétales, qui a su par son enseignement remarquable et son esprit méthodique me donner goût à la recherche et qui a bien voulu suivre l'évolution de mes travaux et rapporter sur leur valeur et leur signification.

Mes remerciements vont aussi au personnel de l'Institut qui a participé à la réalisation de mes travaux.

Je m'adresse tout particulièrement au Dr T. Vu Duc, ingénieur chimiste, chef des travaux, pour ses conseils techniques, ainsi qu'à Mlle Ch. Yerly et M. P. Madelaine qui, malgré leurs occupations, ont bien voulu m'aider pendant la période de rédaction de ce travail.

Je rends hommage à Mme A.-M. Neukomm pour son dévouement dans la dactylographie de la thèse.

Table des matières

	Pages
A V A N T - P R O P O S	
Généralité	1
Problèmes étudiés	4
C H A P I T R E I - Méthodologie	7
1° Introduction	7
2° Les méthodes actuelles	7
2.1. Hydrolyse des 17-oxo-stéroides conjugués	9
2.1.1. hydrolyse acide simple	9
2.1.2. hydrolyse acide en milieu organique	11
2.1.3. hydrolyse enzymatique	14
2.2. Extraction des 17-oxo-stéroides libres	15
2.3. Purification de l'extrait	16
2.4. Dosage final de l'extrait	20
2.4.1. Dosage par colorimétrie	20
I. Réaction de Zimmermann	20
a) méthode de Callow	21
b) méthode de Holtroff et Koch	21
II. Réaction de Pinkus	25
2.4.2. Dosage par polarographie	25
2.4.3. Dosage par chromatographie en phase gazeuse	25
3° Recherche d'une méthode appropriée au problème posé	26
3.1 Recherches sur diverses méthodes physico-chimiques	26

3.1.1. Méthode colorimétrique de dosage des 17-oxo-stéroides: réaction de Zimmermann selon Corker et Norymberski 26

I. Matériel et méthode 26

I.1. Matériels et réactifs 26

I.2. Méthode 26

II. Etudes détaillées de la méthode 27

a) effet de la concentration en métadinitrobenzène 27

b) effet du volume du benzyltriméthylammonium hydroxyde (BTMH) à 40% aqueux 28

c) effet du temps d'incubation 29

d) effet de la dilution finale de la réaction colorée 30

e) effet de la lumière 30

f) sensibilité de la méthode 31

g) application de la méthode à l'urine humaine 32

III. Discussion 33

3.1.2. Recherche d'un système de séparation des principaux métabolites des 17-oxo-stéroides dans l'urine humaine par chromatographie sur couche mince 34

I. Matériel et méthode 35

I.1. Matériels et réactifs 35

I.2. Méthode 36

a) préparation des plaques 36

b) développement des plaques 36

c) élution des spots 37

II. Résultats

II.1. Reproductibilité des Rf 38

II.2. Taux de récupération des substances séparées 39

III. Discussion

3.1.3. Recherche d'un système de séparation des stéroides urinaires par chromatographie en phase gazeuse 41

I. Matériel et méthode 42

I.1. Matériels et réactifs 42

I.2. Méthode 42

I.2.1. préparation de la colonne 42

a) silylation du verre 43

b) remplissage du support imprégné de la phase stationnaire 43

c) conditionnement de la colonne 43

- conditionnement à haute température 43

- efficacité de la colonne 43

- détermination du débit optimal du gaz porteur 44

I.2.2. préparation des dérivés TMSi de stéroides de référence 44

I.2.3. Analyse qualitative 45

a) critère du temps de retention relatif (T_{RR}) 45

b) critère du nombre stéroidique (N.S) de Vandenheuvel 45

1.2.4. Analyse quantitative 46

II. Résultats 46

a) étude de la linéarité de la réponse du détecteur 46

b) précision de la mesure en CPG (chromatographie en phase gazeuse) 46

c) screening de stéroides de référence sur trois phases: OV-1 3%, OV-17 3%, OV-225 3%. Détermination du T_{RR} par rapport au 5α-cholestane et du N.S 47

d) séparation d'un mélange standard des 7 principaux métabolites des 17-oxo-stéroides, du pregnandiol et du pregnantriol de l'urine humaine

III. Discussion 48

3.2. Recherches d'une méthode de préparation et de purification de l'extrait urinaire de souris 50

3.2.1. Préparation d'un extrait urinaire de souris après hydrolyse acide 50

a) méthode

b) dosage de l'extrait par la réaction de Zimmermann 52

c) séparation par couche mince de l'extrait et mise en évidence de substances Zimmermann positives 53

d) tentatives de purification de l'extrait sur colonne: 55

1) colonne de silica-gel 55

2) colonne d'alumine 57

3.2.2. Préparation d'un extrait urinaire de souris après solvolyse et hydrolyse enzymatique par la β-glucuronidase des stéroides conjugués, préalablement extraits par l'acétate d'éthyle 58

a) méthode 58

b) résultats 60

3.2.3. Préparation d'un extrait urinaire de souris après hydrolyse enzymatique et solvolyse des stéroides conjugués préalablement extraits par une colonne d'amberlite XAD-2 63

a) méthode 63

b) résultats 64

4° Conclusion du chapitre I 68

CHAPITRE II - Méthode choisie et étude critique 70

1° Introduction 70

2° Matériel et méthode de préparation des produits à utiliser 70

3° Etude détaillée de certaines étapes de la méthode 76

3.1. Détermination du volume optimal d'élution des stéroides libres et conjugués, préalablement adsorbés sur la colonne d'amberlite XAD-2 76

3.2. Détermination des conditions optimales de l'hydrolyse par l'hélicase: effet de la concentration de l'enzyme, du pH et du temps d'incubation 77

3.2.1. effet de la concentration de l'enzyme et du pH 78

3.2.2. effet de la durée d'incubation 78

3.3. Etude de récupération de stéroides ajoutés à l'urine et à l'eau 81

3.4. Reproductibilité de la méthode sur urine humaine 81

4° Discussion - Etudes critiques 83

C H A P I T R E III - Applications biologiques: Recherches sur les variations physiologiques et physiopathologiques des 17-oxo-stéroides urinaires 87

1° Etude de la variation des 17-oxo-stéroides urinaires, du pregnandiol et du pregnantriol en fonction du sexe et de l'âge chez l'homme 87

2° Etude de la variation des 17-oxo-stéroides urinaires et d'autres stéroides dans l'urine de souris 91

2.1. Application de la méthode choisie à l'urine de souris 91

2.1.1. Prélèvement urinaire chez la souris 91

2.1.2. Résultats obtenus par les colonnes OV-225, OV-17 et OV-1 91

2.2. Tentative d'identification des stéroides par application de critère du nombre stéroidique (N.S) sur les trois colonnes 93

2.3. Etude sur les variations physiologiques et physiopathologiques des substances stéroidiques ou non mesurées par la méthode élaborée 94

2.3.1. Différence sexuelle 94

2.3.2. Rôle de l'âge 96

2.3.3. Effets de surcharge en stéroides 98

2.3.4. Cycle oestral 101

2.3.5. Urine d'animaux porteurs de tumeurs greffées 101

D I S C U S S I O N G E N E R A L E

Nature réelle de substances dosées 107

1° Aspect biochimique 107

1.1. Présence de substances Zimmermann positives séparées par la couche mince 107

1.2. Type de conjugaison des substances séparées 109

1.3. Recherches préliminaires sur la nature de la structure chimique des substances hydrolysées puis séparées par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse 110

2° Aspect biologique 113

C O N C L U S I O N G E N E R A L E 117

****

Avant-propos

La connaissance du métabolisme stéroïdique chez l'homme a fait de nos jours un remarquable progrès, comme en témoigne le grand nombre des travaux publiés sur ce sujet (1-9). On distingue actuellement quatre principaux groupes d'hormones stéroïdes ayant comme structure commune un noyau cyclo-pentano-perhydro-phénanthrène :

1. Les oestrogènes avec 18 atomes de carbone.
2. Les androgènes avec 19 atomes de carbone.
3. Les gestagènes avec 21 atomes de carbone dont le principal représentant est la progestérone.
4. Les cortico-stéroïdes avec également 21 atomes de carbone, formés par les minéralo-corticoïdes et les gluco-corticoïdes.

La plupart des androgènes, ainsi que l'oestrone appartiennent au groupe des 17-oxo-stéroïdes puisqu'ils possèdent un groupement cétonique en position 17. Toutes ces hormones sont d'origines testiculaire, ovarienne et surrénalienne. Elles se trouvent dans le sang et sont excrétées dans l'urine sous forme conjuguée à l'acide glucuronique (gluco-conjongués ou glucuronide) et à l'acide sulfurique (sulfo-conjugués). On les trouve également en faible quantité à l'état libre.

Plusieurs stéroïdes ont été isolés, leur structure chimique élucidée et leurs effets biologiques reconnus. Citons, à titre d'exemple, les sept principaux métabolites 17-oxo-stéroïdes trouvés dans l'urine humaine: l'androstérone, l'étiocholanolone et la déhydro-épiandrostérone dont la formule élémentaire est $C_{19}O_2$, la 11-oxo-androstérone, la 11-oxo-étiocholanolone, la 11β-hydroxy-androstérone et la 11β-hydroxy-étiocholanolone dont la formule élémentaire est $C_{19}O_3$.

Si ces hormones sont bien connues chez l'homme, il n'en va pas de même chez les animaux et surtout chez les animaux de laboratoire.

Les stéroïdes éliminés dans l'urine de certains animaux, tels que le Rat, la Vache, ont été souvent étudiés (10-17) (26) (18-19). Les recherches ont surtout porté sur leur mise en évidence d'une part, et, d'autre part, sur leur identification.

Chez les rongeurs, la Souris est certainement l'animal le moins bien étudié à ce point de vue. Très peu de travaux ont été publiés et si les corticostéroïdes plasmatiques et urinaires de la souris ont fait l'objet de quelques publications, les androgènes et les oestrogènes n'ont pratiquement pas été recherchés de façon systématique et détaillée.

Les premières tentatives ont, à notre connaissance, commencé dans les années quarante où Dorfmann et Gardner mirent en évidence par des méthodes biologiques la présence d'un matériel oestrogénique dans l'urine de souris normales et de souris ovariectomisées, porteuses de tumeurs de la surrénale (20). Ils constatent que ces dernières possèdent un matériel oestrogénique, exprimé en U.I., quatre fois plus élevé que dans le cas de souris normales.

Dans la même année, Karnowski et coll.(21), travaillant sur deux souches de souris porteuses de tumeurs mammaires spontanées, trouvent également dans l'urine de ces souris, et toujours par des méthodes biologiques, un matériel oestrogénique augmenté. Parallèlement à l'étude des oestrogènes, Karnowski dose les 17-oxo-stéroïdes, dans une fraction neutre d'urine de souris, par la réaction de Zimmermann. Il constate que la coloration développée est semblable mais non identique à celle que l'on obtient avec la même fraction d'une urine humaine. Il conclut que probablement des "17-oxo-stéroïds-like" sont présents

dans l'urine de souris avec d'autres substances cétoniques mais de nature non stéroïdique; celles-ci modifieraient la couleur de la réaction de Zimmermann.

Wilson (1958), par une méthodologie plus proche de celle utilisée de nos jours, met en évidence dans le plasma et dans l'urine de souris porteuses de tumeurs produisant de l'ACTH, la présence d'hormones stéroïdes appartenant aux groupes des 17-oxo-stéroïdes et des corticostéroïdes (22).

Les corticostéroïdes sont de toutes les hormones stéroïdes les mieux étudiées actuellement. Wilson, par exemple (22), parallèlement à ses recherches sur les 17-oxo-stéroïdes, a étudié la présence des corticostéroïdes dans le plasma et l'urine de souris. Il constate une absence totale du cortisol dans le plasma et l'urine. L'absence également de la corticostérone dans l'urine, mais sa présence de façon prédominante dans le sang.

Treimann (1969) (23), confirme les résultats de Wilson par des méthodes plus modernes (fluorométrie, double marquage isotopique) chez quatre races de souris sauvages, après un stress électrique. Une seule des quatre races possède du cortisol dans le plasma, ce qui est en contradiction avec les résultats de Wilson. Ceci conduit à penser que la présence ou l'absence du cortisol dans le plasma de souris dépend de sa race.

D'autres corticostéroïdes ont été également identifiés dans le plasma de souris, tels que le 11-desoxy-corticostérone, le 17-α-OH-11-desoxy-corticostérone et le 19-OH-11-desoxy-cortisol.

A notre connaissance et à l'exception du travail de Jeannet (24) qui a étudié la répartition de substances qui pourraient être apparentées à des 17-oxo-stéroïdes et des oestrogènes dans les différents organes de souris normales et cancéreuses (réaction de Zimmermann et Kober

sur extraits alcooliques d'organes) aucun travail n'a été publié jusqu'à présent au sujet de ces substances dans l'urine ou le sang de souris.

Le problème

Notre sujet d'étude s'inscrit dans le cadre plus large d'une recherche sur les effets de l'administration d'anticonceptionnels sur l'incidence tumorale mammaire chez la souris.

Une telle recherche est motivée par le fait que la souris a été et reste l'animal de choix pour l'étude des corrélations endocriniennes en rapport avec le développement des tumeurs mammaires. A certains égards, le comportement de la glande mammaire de la souris est semblable à celui de la glande mammaire chez la femme, les deux espèces pouvant être considérées comme relativement très sensibles à ce type de cancer.

Par ailleurs, l'utilisation de plus en plus importante des anticonceptionnels par la femme pose le problème, bien connu chez la souris, de la provocation du cancer mammaire par les oestrogènes.

Compte tenu des corrélations hypophyso-ovariennes et de leur impact sur le territoire-cible que représente la glande mammaire, la question reste ouverte pour l'instant de savoir si l'administration chronique de faibles doses d'anticonceptionnels formés d'un mélange d'oestrogène et de gestagène de synthèse est susceptible d'augmenter l'incidence tumorale d'espèces animales sensibles ou au contraire de la diminuer.

L'expérimentation générale conçue pour répondre à cette question a été planifiée de telle façon qu'il soit possible d'administrer les anticonceptionnels à la souris en tenant compte aussi précisément que possible du cycle oestral. En d'autres termes, on a considéré comme une

nécessité de répéter sur la souris, aussi exactement que possible, les modes d'administration des anticonceptionnels chez la femme.

L'expérimentation générale a donc compris préalablement

a) l'étude du cycle oestral par l'examen cytologique des frottis vaginaux;

b) la régulation du cycle par le dégroupage des femelles et leur mise en contact - en cages contigües - avec les mâles (méthode de Whitten)(25);

c) l'administration d'anticonceptionnels dans une phase bien déterminée du cycle pour une période (ou un nombre de cycles) équivalente à celle d'une femme ne désirant pas d'enfant entre l'âge de 17 à 22 ans, par exemple.

La programmation du travail de recherches comporte, après la cessation de la médication anticonceptionnelle, l'étude du comportement physique et biochimique des animaux et l'examen détaillé de leur pathologie au moment de leur mort spontanée.

Le dosage des hormones stéroïdes dans l'urine représente un des moyens complémentaires de l'examen cytologique des frottis vaginaux pour suivre l'évolution fonctionnelle du système endocrinien impliqué dans l'éventuelle action tumorale ou anti-tumorale des anticonceptionnels.

Or, comme cela a été noté dans notre avant-propos, nous ne disposions pas, jusqu'à ce jour, de méthodes d'analyses suffisamment précisées et sûres des stéroïdes sexuels urinaires chez la souris. C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris le présent travail.

CHAPITRE I - Méthodologie

1° Introduction.

Pour des raisons de facilités, une partie de nos travaux préliminaires ont été faits sur l'urine humaine en partant de l'idée que si une méthode analytique s'appliquait parfaitement bien au dosage des 17-oxo-stéroides dans l'urine humaine, il n'y a pas de raison pour que la même méthode ne soit applicable au dosage des mêmes stéroides dans l'urine de souris.

Cette hypothèse n'est valable qu'à condition que l'urine de souris se comporte effectivement de la même manière que l'urine humaine au cours des principales étapes de la méthode employée. Or, l'expérience nous a montré que souvent cela n'est pas la cas.

On notera encore que dans le cas de l'urine humaine, les méthodes de dosage des 17-oxo-stéroides urinaires sont parfaitement maîtrisées, alors que l'urine de souris pose indéniablement beaucoup de problèmes encore irrésolus.

Mais avant d'entrer plus directement dans la description de nos travaux expérimentaux et pour en faire suivre plus aisément le déroulement, nous avons jugé nécessaire de donner une revue d'ensemble des méthodes actuelles de dosage des stéroides urinaires.

2° Les méthodes actuelles.

Comme nous l'avons rappelé dans notre avant-propos, les 17-oxo-stéroides se trouvent dans l'urine humaine à l'état soluble, grâce à leurs formes conjuguées (gluco-conjugués et sulfo-conjugués).

Les gluco-conjugués forment environ 65-85 % des stéroides totaux urinaires (27). Ils sont représentés, en majeure partie, par l'androstérone, l'étiocholanolone et leur formes oxygénées (28).

Les sulfo-conjugués sont surtout formés par la déhydroépiandrostérone (DHA), par une faible partie de l'androstérone (10 %) et de l'étiocholanolone (15-25 %) (29).

Le dosage de ces substances se réalise pratiquement et d'une manière générale en quatre étapes fondamentales.

1. Une hydrolyse dont la modalité varie d'un laboratoire à un autre. Elle permet de briser les liaisons de conjugaison, et de rendre ainsi les stéroides libérés extractibles par les solvants organiques.

2. Une extraction des stéroides libres par un solvant. Généralement, d'autres substances liposolubles sont extraites en même temps que les stéroides, ce qui donne un extrait chargé de pigments, d'acides organiques et de substances de nature non stéroidique.

3. Une purification de l'extrait qui peut commencer par un lavage au NaOH, $NaHCO_3$ et de l'eau. Les oestrogènes et les acides organiques passent dans la phase aqueuse de NaOH et les 17-oxo-stéroides restent dans la phase organique. On peut considérer cette purification de grossière, car l'extrait obtenu après évaporation de la phase organique reste généralement sale et n'est pas utilisable tel quel pour une séparation des stéroides. Si les exigences de l'analyse nécessitent une purification plus poussée, l'extrait peut alors, être purifié par des méthodes telles que la chromatographie sur colonne, la chromatographie sur couche mince ou sur papier.

4. Le dosage quantitatif de l'extrait purifié qui se fait par des méthodes physico-chimiques comme la colorimétrie, la polarographie, la fluorescence et la chromatographie en phase gazeuse.

Nous examinons ci-après plus en détail chacun de ces étapes en vue d'en dégager les éléments susceptibles de nous conduire à une méthode appropriée au cas qui nous intéress

2.1 Hydrolyse des 17-oxo-stéroides conjugués.

L'hydrolyse des 17-oxo-stéroides conjugués a fait l'objet de plusieurs publications depuis que les cliniciens ont commencé à s'intéresser à leur dosage (30-40)(9).

Les méthodes sont nombreuses. Chaque laboratoire utilise en quelque sorte, sa propre méthode d'hydrolyse, en fonction des besoins de ses recherches.

D'une manière générale, trois méthodes d'hydrolyse sont employées de nos jours:

1.l'hydrolyse acide simple
2.l'hydrolyse acide en milieu organique
3.l'hydrolyse enzymatique.

2.1.1. Hydrolyse acide simple:

La littérature est riche en procédés hydrolytiques, (9)(39)(41-46). Mais si les procédés varient, le principe en reste cependant toujours le même.

L'hydrolyse consiste à chauffer l'urine pendant un certain temps, à l'ébullition et en présence d'un acide minéral fort. L'acide le plus employé est l'HCl (10 vol.acide + 100 vol.urine). L'urine est chauffée pendant exactement 10 min, (27)(44)(47). La concentration de l'acide peut varier jusqu'à 30 volumes pour 100 volumes d'urine (41-42)(45)(48-49). La durée de l'hydrolyse varie également de 10-20 min (50), et dans certains cas de 1-2 heures (51). Certains auteurs préconisent de faire l'hydrolyse en plongeant l'urine dans l'eau bouillante pendant un temps déterminé (41)(43)(50). D'autres conseillent de la faire sous reflux (52-54).

L'acide sulfurique peut remplacer l'HCl. Vestergaard hydrolyse l'urine avec l'acide sulfurique à 40 % en présence du benzène (39-40). Les stéroides libérés passent directement dans le solvant et sont moins endommagés par l'acide.

Quelque soit le procédé employé, l'hydrolyse acide est par définition destructive pour les stéroides (9)(27-28)(36). Elle provoque de nombreuses transformations dans la structure des stéroides. Ces transformations se manifestent sous formes de déhydratation, halogénation et réarrangement moléculaire (50).

Le groupe des 17-oxo-stéroides le plus touché par l'hydrolyse acide est celui des sulfo-conjugués. La déhydro-épiandrostérone-sulfate est détruite, transformée en $\Delta^{3,5}$androstadiène-17-one, en Δ^{5}- 3β-chloroandrostène-17-one et en 3,5-cyclo-androstane-6β-ol-17-one. La prédominence d'un dérivé donné dépend des conditions de l'hydrolyse (27). Le sulfate de l'androstérone est détruit à 75 % en présence de HCl à 15 %, à 100 °C pendant 10 min (55).

Les gluco-conjugués de l'androstérone et de l'étiocholanolone sont moins touchés (28). Leurs analogues en 11-oxygénés sont également résistants (28). Par contre, les 11β-OH sont très fragiles et se transforment en Δ^{9}- analogues, (27-28)(36)(50).

En plus des effets néfastes des acides sur les sulfo-conjugués, on observe une formation importante de pigments urinaires durant l'hydrolyse. En effet, l'urine contient des substances organiques, qui sous l'effet d'un acide fort à chaud libèrent des pigments qui sont parfois très abondants, et rendent le plus souvent nécessaire une purification de l'extrait. Ces pigments posent presque toujours des problèmes analytiques comme nous le verrons au cours de ce travail. Ils sont particulièrement abondants dans l'urine de souris.

En somme, l'hydrolyse acide est une méthode qui présente l'avantage d'être rapide et facilement réalisable. Elle a les inconvénients de former des pigments urinaires d'une part et de transformer une grande partie des 17-oxo-stéroides, surtout les sulfo-conjugués d'autre part.

Ce sont les raisons pour lesquelles elle ne peut pas être utilisée pour la préparation des échantillons urinaires nécessaires à la chromatographie. Par contre, elle continue à être utilisée pour les déterminations globales des 17-oxo-stéroides par la réaction de Zimmermann. En effet, les produits de transformation formés restent des 17-oxo-stéroides et le pouvoir chromogène de ces produits ne modifie pas trop sensiblement le dosage par la réaction de Zimmermann (33).

2.1.2. Hydrolyse acide en milieu organique.

On distingue dans ce type d'hydrolyse deux systèmes:

a) la solvolyse

b) l'hydrolyse par l'acide perchlorique.

a) La solvolyse.

C'est un procédé hydrolytique qui permet de rompre les liaisons de conjugaison esters-sulfates des 17-oxo-stéroides. Elle se fait dans un solvant organique dans des conditions bien déterminées. Il en existe trois modalités:

1. la solvolyse par extraction continue à l'éther.

Les sulfo-conjugés solubles dans la phase aqueuse (urine) sont extraits à pH inférieur à 1 par l'éther de façon continue, pendant 24-72 heures. De cette manière, les sulfo-conjugués sont hydrolysés spécifiquement sans altération (38)(56-57).

Les inconvénients de cette méthode sont la durée de l'hydrolyse et la persistance des pigments urinaires qui passent dans l'éther (27).

2. La solvolyse par le 1,4-dioxane.

Grant et Beall ont utilisé cette méthode pour hydrolyser les sulfates d'oestrogènes (58) et Cohen et Oneson l'ont appliquée à l'hydrolyse des 17-oxo-stéroides sulfates (59). Elle consiste à effectuer l'hydrolyse dans le dioxane contenant de l'acide trichloroacétique à 10 %. La durée de l'hydrolyse est de 4 heures à 25 °C ou de 10 min. à 100 °C.

3. La solvolyse par l'acide sulfurique dans l'acétate d'éthyle (30).

C'est la méthode la plus employée actuellement pour hydrolyser les sulfo-conjugués. Ces derniers sont incubés, après leur extraction préalable du milieu aqueux, dans l'acétate d'éthyle acidifié, pendant un certain temps, et à une température donnée. On peut procéder de deux manières:

- l'urine est amenée à une concentration de 2 M avec l'acide sulfurique et extraite par l'acétate d'éthyle. Ce dernier est incubé, après déshydratation, à 38-39 °C pendant 16-24 heures. Les sulfo-conjugés sont, dans ces conditions, spécifiquement hydrolysés et les gluco-conjugués restent intacts (9)(60-62).
- l'urine est amenée à pH 1 avec l'acide sulfurique, additionnée de NaCl (20 g/100 volumes), puis extraite par l'acétate d'éthyle. Ce dernier est incubé comme ci-dessus.

Le mécanisme de cette réaction est mal connu. On pense qu'il y a un déplacement du radical SO_3^- du stéroide sulfaté sur l'oxygène du solvant:

$$ROSO_3^- + H^+ \longrightarrow ROSO_3H \longrightarrow RO^+SO_3^-$$

$$RO^+SO_3^- + C\lessgtr^{x}_{y} \longrightarrow ROH + SO_3^-O^+\lessgtr^{x}_{y}$$

R = stéroide.

Curtius (38) ne recommande pas cette méthode, car la DHA-sulfate est partiellement hydrolysée, (57 % de récupération).

b) Hydrolyse par l'acide perchlorique (31-32)(63).

Les 17-oxo-stéroïdes gluco et sulfo-conjugués, préalablement extraits du milieu aqueux, sont hydrolysés dans un solvant organique peu polaire, tels que l'acétate d'éthyle ou le tétrahydrofurane (THF), en présence de l'acide perchlorique à faible concentration. La durée et la température de l'hydrolyse dépendent du solvant employé.

Une des conditions importantes pour assurer une hydrolyse totale est la teneur du solvant en eau. Généralement, elle ne doit pas dépasser 0,7% (31).

Avec l'acétate d'éthyle, les 17-oxo-stéroïdes sont hydrolysés à 23°C pendant 2-3h. La concentration de $HClO_4$ est de 0,01 M (32). Si l'hydrolyse se fait dans le THF, la concentration en $HClO_4$ est de 0,1 M. L'hydrolyse est totale à 50°C pendant 3 h. (31)

Cette méthode d'hydrolyse paraît séduisante, car elle présente l'avantage d'être rapide et peu coûteuse. Jacobshon et De Paoli s'accordent sur sa supériorité vis-à-vis de l'hydrolyse acide. Selon ces auteurs, elle ne provoque pas d'altération dans la structure des 17-oxo-stéroïdes, spécialement la DHA, le 11β-OH-androstérone et le 11β-OH-étiocholanolone qui sont généralement très altérés par HCl (31).

Avec la chromatographie en phase gazeuse, Cawley (33) a comparé cette méthode à l'hydrolyse acide et à l'hydrolyse enzymatique. Il a confirmé les observations de Jacobshon et De Paoli, mais trouve que malgré sa supériorité sur l'hydrolyse acide, elle reste inférieure à la méthode de l'hydrolyse enzymatique. Curtius (38) ne recommande pas son utilisation pour une séparation par la chromatographie en phase gazeuse. Des pics interférentiels apparaissent sur le chromatogramme, dûs probablement à la décomposition du THF.

C'est également l'avis de Matthijssen (64) qui, après une très intéressante étude, préfère l'utilisation de l'hydrolyse enzymatique combinée à la solvolyse de Burstein et Libermann (31).

2.1.3. Hydrolyse enzymatique.

Depuis une quinzaine d'années, l'hydrolyse des 17-oxo-stéroïdes par des préparations enzymatiques tend à remplacer progressivement les autres méthodes hydrolytiques. Cette méthode est, sans doute, la seule qui présente l'avantage de ne pas altérer la structure moléculaire des stéroïdes.

Elle consiste à incuber l'urine (ou les 17-oxo-stéroïdes conjugués préalablement extraits de l'urine) dans un milieu tamponné en présence d'un extrait enzymatique pendant 24-72 h. à 37°C.

On distingue deux types de préparations enzymatiques d'origine animale :

1. Les β-glucuronidases qui sont spécifiques des gluco-conjugués.
2. Les sulfatases qui sont spécifiques de certaines configurations de stéroïdes sulfatées.

Ces enzymes sont préparées à partir du foie, de la rate et des organes génitaux de mammifères. On les trouve également chez l'Escherichia Coli, l'Helix pomatia et chez quelques mollusques, tels que la Littoria Littora et la Patella Vulgata (9)(27).

Comme toute méthode d'analyse, l'hydrolyse enzymatique présente certains inconvénients que nous résumons brièvement:

- Le temps nécessaire à une hydrolyse maximale est long. D'une manière générale, on incube de 24-72h. C'est un procédé qui est assez long pour l'analyse clinique de routine. Certains auteurs préconisent de faire l'hydrolyse à 60-62°C pendant 30-60 min. (65-66).

- Les β-glucuronidases sont spécifiques pour tous les gluco-conjugués. Par contre, les sulfatases n'hydrolysent pas de manière régulière et systématique les divers sulfo-conjugués. On note une différence d'action selon la provenance de l'enzyme ou selon la configuration des liaisons de conjugaison. Il semble que la configuration 3α-5α ne soit pas du tout touchée par aucune des sulfatases.

A cet égard, par exemple, l'androstérone-sulfate et le 5α-pregnanolone-sulfate ne sont pas attaqués. A cause de cette non spécificité absolue des sulfatases, plusieurs auteurs préfèrent associer à l'hydrolyse par la β-glucuronidase, la solvolyse de Burstein et Libermann.

- Un dernier inconvénient de cette méthode est dû à la présence dans l'urine d'inhibiteurs enzymatiques qui sont, généralement, des ions phosphates, sulfates, probablement d'autres inhibiteurs de nature inconnue.

Dans le but de remédier à cet inconvénient, plusieurs procédés ont été proposés :

1. Diluer l'urine en fonction de sa teneur en phosphate (67) avant de faire l'hydrolyse enzymatique en vue de diluer la teneur en inhibiteurs et les empêcher ainsi d'intervenir dans l'activité enzymatique.
2. Précipiter les phosphates et les sulfates par $BaCl_2$ à pH 11 (9) ou acétate de Ba à pH 11,5 (68)
3. Extraire les 17-oxo-stéroïdes conjugués de l'urine et hydrolyser par la suite l'extrait (9) 69-71) (30)(32)(48)

2.2. Extraction des 17-oxo-stéroïdes libres

Après l'hydrolyse des 17-oxo-stéroïdes, ces derniers deviennent miscibles dans les solvants organiques, tels que l'éther, le benzène, les solvants chlorés et l'acétate d'éthyle.

Le solvant de choix doit, en principe, assurer une extraction quasi totale des stéroïdes libres avec un minimum de volume, sans entraîner les impuretés et sans former d'émulsion. Malheureusement dans la pratique un tel solvant n'existe pas.

Le benzène est un excellent solvant des stéroïdes neutres. A cause de la toxicité de ses vapeurs, il est de moins en moins employé.

Les solvants chlorés sont également de bons solvants mais entraînent trop de pigments (50). Henry emploie le trichloroéthylène qui, selon lui, extrait bien les 17-oxo-stéroïdes et n'entraîne que le minimum de pigments (27).

Le tétrachlorure de carbone est un excellent solvant, peu soluble dans l'eau, mais d'odeur désagréable. L'éther est aussi un bon solvant mais inflammable et forme facilement des peroxydes.

Selon Jayle (9), l'éther de pétrole est un mauvais solvant des stéroïdes. Cependant, Peterson (50) trouve que ce solvant convient parfaitement bien à l'extraction des 17-oxo-stéroïdes ayant deux fonctions cétoniques ($C_{19}O_2$), tout en étant mauvais extracteur des 17-oxo-stéroïdes avec trois fonctions cétoniques ($C_{19}O_3$).

Un mélange d'éther de pétrole avec le benzène à partie égale donne un solvant très efficace pour l'extraction des 17-oxo-stéroïdes. Cette extraction est totale lorsque le mélange éther de pétrole-benzène est utilisé dans la proportion de 5 vol. de solvant pour 1 vol. urinaire (en une seule extraction). Avec ce procédé, peu de pigments, de chromogènes et de substances interférentielles sont entraînées dans ce mélange de solvants (50).

2.3. Purification de l'extrait

Il existe plusieurs procédés pour purifier l'extrait organique contenant les 17-oxo-stéroïdes libres. Cet extrait est, comme nous l'avons déjà mentionné, surchargé de pigments, d'acides organiques et d'autres impuretés.

1. Lavage avec NaOH.- Le procédé de purification le plus répandu consiste à faire un lavage avec NaOH 0,1-2N, suivi d'un lavage à l'eau. Le NaOH débarrasse l'extrait d'une grande partie de pigments colorés, et enlève surtout les oestrogènes de la phase organique.

D'une manière générale, un lavage de 2-3 fois avec 1/10 vol. est suffisant. Une agitation vigoureuse de la phase organique, en présence de NaOH en pastilles, a été également proposée (41)(72). L'avantage de cette technique est sa rapidité

car elle ne nécessite pas un lavage répété de la phase organique, comme c'est le cas avec NaOH aqueux. D'autre part, une séparation de deux phases n'est plus nécessaire. Il suffit d'une simple filtration pour débarasser la phase organique de NaOH.

La purification avec NaOH est loin d'être la technique idéale pour permettre un nettoyage total de l'extrait. Ce dernier reste contaminé par certains pigments. C'est une étape qui reste cependant nécessaire et suffisante pour un dosage global des stéroïdes neutres dans l'urine humaine par la réaction de Zimmermann.

Après le lavage avec NaOH, certains auteurs ont proposé une partition de l'extrait entre deux solvants de polarités différentes. Les coefficients de partage des 17-oxo-stéroïdes, vis-à-vis des solvants organiques ne sont pas les mêmes. Il y a plus d'affinité pour les solvants peu polaires, tel que le benzène, que pour les solvants polaires. Sparagana (73) conseille une partition entre le benzène et le méthanol à 50%. Il sépare ainsi les corticostéroïdes des 17-oxo-stéroïdes qui passent dans le benzène. D'autres systèmes ont également été employés, tels que la partition entre l'hexane et l'éthanol à 70% (22), entre l'éther de pétrole et l'éthanol à 70% (15) (74).

La technique en elle-même est très simple à réaliser, mais son inconvénient est d'augmenter le temps de manipulation.

2. Séparation des fractions cétoniques et non-cétoniques (réactif Girard).- La séparation de l'extrait urinaire en fractions cétonique et non cétonique par les réactifs de Girard (75)(64) peut contribuer à la purification de la fraction des 17-oxo-stéroïdes.

Le principe de cette technique est basée sur le fait que des hydrazides à fonction ammonium quaternaire, le réactif T (chlorure de triméthyacéthyldrazide d'ammonium) et le réactif P (chlorure d'acéthydrazide de pyridinium) de Girard forment avec les cétones, en milieu acide, un complexe soluble dans l'eau et insolubles dans les solvants non hy-

Grâce à cette propriété, les substances non cétoniques sont extraites par l'éther ou le chloroforme et le complexe cétonique hydrosoluble est hydrolysé par HCl, à la température ambiante. Après hydrolyse, les stéroïdes cétoniques sont réextraits par l'éther de la phase aqueuse.

3. Chromatographie d'adsorption.- La chromatographie d'adsorption, chromatographie sur couche mince (CCM) ou chromatographie sur colonnes (CC), est la technique la plus employée pour purifier l'extrait urinaire.

a) CCM :

La CCM, depuis sa commercialisation, a fait l'objet de plusieurs travaux (72)(77). C'est une technique rapide et facile à exécuter. Kirschner, dans un remarquable travail, dose les 17-oxo-stéroïdes urinaires individuellement et les métabolites de la progestérone par la chromatographie en phase gazeuse après une purification sur CCM (76).

Leluan et Gairard publient une méthode de séparation de ces hormones par CCM et leur quantification par la réaction de Zimmermann (78-79).

A notre avis, cette technique de chromatographie peut être utilisée pour la purification et la séparation des 17-oxo-stéroïdes, à condition que l'extrait urinaire ne soit pas trop chargé de pigments. On peut l'utiliser également, comme technique de purification, surtout lorsque l'extrait est analysé par la chromatographie en phase gazeuse. Dans ce dernier cas, il faut prendre des précautions et s'assurer des conditions opératoires, telles que la pureté de l'adsorbant (le blanc de l'adsorbant ne doit pas donner des pics interférentiels), le taux de récupération après élution de la plaque, etc..

La récupération des stéroïdes séparés par CCM n'est jamais à 100%. Elle dépend de la nature de l'adsorbant, des solvants d'élution et de l'habilité du manipulateur (grattage des taches et transfert dans la vaisselle d'élution). Si ces trois facteurs sont bien déterminés, on peut alors assurer une récupération maximale.

b) CC :

La purification par la chromatographie d'adsorption sur colonnes offre l'avantage, par rapport à la CCM, d'être une technique qui ne nécessite pas une manipulation répétée de l'extrait.

La méthode consiste à introduire l'extrait dans la colonne, à fixer les stéroïdes sur l'adsorbant, et à faire passer des solvants de polarités différentes. De cette façon, les stéroïdes sont élués par fractions tout en étant purifiés. Mais il arrive parfois qu'une fraction donnée quitte la colonne contaminée avec des impuretés éluées en même temps. Dans ce cas, pour séparer ces impuretés de la fraction intéressante, on peut faire appel à d'autres techniques complémentaires de purification. Par exemple, une autre colonne, préparée avec un autre adsorbant ou employant un autre système de solvants. On peut également purifier les fractions contaminées par la CCM ou par la chromatographie sur papier.

En réalité, la recherche d'un certain degré de purification de l'extrait est conditionnée en grande partie par le but recherché. Il ne faut pas oublier en effet que plus le nombre des manipulations augmente, moins la récupération est bonne.

Il n'est pas inutile de rappeler ici qu'une des conditions importantes d'une bonne utilisation de la colonne, que ce soit dans le but de purifier ou de séparer les 17-oxo-stéroïdes est, comme cela est bien connu aujourd'hui, l'activité de l'adsorbant d'une part et, d'autre part, sa standardisation.

On définit l'activité d'un adsorbant d'après sa teneur en eau. Elle est exprimée en unités Brookmann (80).

Généralement, l'industrie chimique met à disposition des laboratoires des adsorbants avec un degré d'activité bien définie, comme l'alumine, le silica-gel, le florisil, etc. On peut la modifier, selon les besoins, par hydratation ou déshydratation (désactivation ou activation).

La standardisation de l'adsorbant se fait habituellement avec des colorants, mais il est préférable, dans le cas des stéroïdes, d'utiliser un stéroïde de référence dont la structure est proche du groupe à étudier pour standardiser l'adsorbant (9).

L'alumine avec une activité II-III est l'adsorbant qui s'adapte le mieux à la purification des 17-oxo-stéroïdes (9). Certains auteurs préfèrent l'emploi de l'acide silicique (81)(13)(74), d'autres préfèrent le silica-gel (82-83).

Actuellement, une technique de séparation et de purification par colonne de sephadex LH-20 commence à prendre place. Elle pourrait être très intéressante, car le sephadex, malgré la lenteur du débit d'écoulement, ne nécessite pas d'activation, ni l'emploi de solvants à polarités croissantes.

2.4. Dosage final de l'extrait

On distingue trois principales techniques de dosage de l'extrait :

2.4.1. Dosage par colorimétrie

I. Réaction de Zimmermann

C'est en 1935 que Zimmermann (84-85) a proposé l'appli- d'une méthode colorimétrique, entre les cétones et le méta-dinitro-benzène, au dosage des 17-oxo-stéroïdes.

Le principe de la réaction est basé sur le fait que les 17-oxo-stéroïdes, en milieu alcalin, réagissent avec le MDB alcoolique et donnent une coloration violet-pourpre dont le maximum d'absorption se situe à 520 nm.

Marlow (86) a démontré que le développement de la couleur nécessitait la présence d'un groupement CH_2 adjacent au groupement cétonique.

Malgré les modifications apportées à la méthode originale de Zimmermann, la majorité des laboratoires utilisent pour leurs dosages, l'une des deux modalités de Callow (87) ou de Holtroff et Koch (88).

La différence entre les deux modalités réside dans le fait que celle de Callow utilise un milieu alcalin alcoolique, tandis que celle de Holtroff et Koch utilise un milieu alcalin aqueux.

a) méthode de Callow

L'extrait urinaire est incubé en présence de KOH 2,5 alcoolique, avec le MDB à 1-2% pendant 60 minutes, à 25°C et à l'obscurité. Après développement de la couleur, la dilution se fait avec l'alcool absolu et la D.O est lue à 520 nm, en appliquant une correction absorptiométrique que nous verrons plus loin.

b) méthode de Holtroff et Koch

L'extrait urinaire alcoolique est incubé, en présence de KOH 5 N aqueux, avec le MDB à 1% pendant 90 minutes à 105 minutes (36), à 25°C et à l'obscurité. Après dilution avec un mélange alcool-eau, la D.O est lue à 520 nm sans application de la correction absorptiométrique. Dans cette méthode, cette correction n'est pas valable.

Nous résumons brièvement les avantages et les inconvénients de chaque méthode. Celle de Callow présente les avantages d'assurer une linéarité entre les concentrations des 17-oxo-stéroïdes et la D.O sur une échelle assez grande de concentrations. Le temps de développement est relativement court par rapport à la méthode de Holtroff et Koch. L'application de l'équation de correction absorbtiométrique est valable. Le but de cette équation est d'éliminer les absorptions dues à des pigments urinaires interférentiels.

Les inconvénients se résument par l'instabilité de la solution alcoolique de KOH. En effet, cette solution ne se conserve que quelques jours à la glacière. D'autre part, sa préparation n'est pas très commode à cause de sa dissolution difficile dans l'éthanol. Wilson conseille de la stabiliser avec l'acide ascorbique (89).

Le témoin "réactif" (MDB + KOH) donne généralement une absorption plus élevée que dans le cas de KOH aqueux (50).

Les coefficients d'absorption des 17-oxo-stéroïdes ne sont pas les mêmes dans la méthode de Callow (50)(36)(27)(9). Par exemple, l'étiocholanolone a un coefficient d'absorption plus élevé que l'androstérone et la DHA.

Citons finalement la perte de l'intensité colorée en fonction du temps. Elle est de l'ordre de 20% en 60 minutes (5).

La méthode de Holtroff et Koch présente les avantages de travailler dans un milieu alcalin aqueux. Le KOH 5 N est très stable dans le temps; il peut être conservé pendant des mois sans altération. D'autre part, les 17-oxo-stéroïdes ont des coefficients d'absorption très proches. Finalement le témoin "réactifs" donne une absorption faible par rapport à la méthode de Callow.

Les inconvénients de cette méthode sont la longue durée d'incubation, la non applicabilité de l'équation de correction absorptiométrique et selon certains auteurs la linéarité entre les concentrations et la D.O. n'est valable que sur une échelle de concentration restreinte.

Problèmes des pigments urinaires

Au cours de l'hydrolyse, des pigments bruns se forment qui sont extraits en même temps que les 17-oxo-stéroïdes ainsi que d'autres substances organiques (chromogènes urinaires, autres stéroïdes, substances de nature non stéroïdique). Le lavage par NaOH et de l'eau ne débarrasse pas l'extrait complètement de ces pigments. Une partie reste donc dans l'extrait final destiné à une détermination colorimétrique par la réaction de Zimmermann.

La teneur de ces pigments varie d'une urine à une autre. Comme nous le verrons plus tard, ils sont très abondants dans l'urine de souris. On peut évaluer leur teneur dans l'urine humaine, en faisant le rapport D.O 520 / D.O 420, car à 520 nm l'absorption est maximum pour les 17-oxo-stéroïdes et minimum pour ces pigments, tandis que à 420 c'est l'inverse.

La présence de ces pigments dans l'extrait gène considérablement la quantification des 17-oxo-stéroïdes. Plusieurs méthodes ont été proposées pour éliminer la source d'erreur due à leur présence.

Correction absorptiométrique d'Allen (90)

C'est une méthode qui a été appliquée par Allen pour corriger l'absorption des 17-oxo-stéroïdes contaminés par des pigments. Elle consiste à mesurer l'absorption de l'extrait à trois longueurs d'ondes différentes. Habituellement, on mesure à 520 nm (max. pour les 17-oxo-stéroïdes) et à deux longueurs d'ondes à équi-distance de part et d'autre de 520 nm.

$$\text{C.O. corr.} = \text{D.O } 520 - \frac{(\text{D.O } 470 + \text{D.O } 570)}{2}$$

Selon Henry (27), deux conditions sont essentielles à l'application de cette équation :

a) le spectrophotomètre de mesure doit avoir des bandes passantes inférieures à 10 nm.
b) le témoin (extrait sans MDB) doit avoir une absorption linéaire entre les deux longueurs d'ondes symétriques.

Extraction du chromogène de Zimmermann par un solvant

La méthode consiste à diluer la réaction finale de Zimmermann avec une solution hydro-alcoolique et de l'extraire avec un solvant comme l'éther (9)(91), le chloroforme (92), le tétrahydrofurane (93), le dichlorométhane (50) et l'acétate d'amyle. Henry (27) a fait une comparaison systématique des solvants extracteurs de 17-oxo-stéroïdes mono, di et tri-cétoniques. Il a mesuré également le rapport des D.O 520/ D.O 420 afin d'évaluer la teneur en pigments qui restaient après extraction du chromogène. Il a conclu que les chromogènes de différents 17-oxo-stéroïdes ne passent pas d'une façon identique dans le solvant. Selon lui, le meilleur solvant est l'éther.

L'éther a en effet l'avantage de ne pas former d'émulsion pendant la séparation de deux phases. Ces dernières se séparent facilement et surtout rapidement. Son inconvénient est sa rapide évaporation. On peut remédier à ceci en maintenant les tubes pendant la mesure colorimétrique dans la glace (27).

Peterson (50) ne partage pas l'avis de Henry. Il conseille l'utilisation du dichlorométhane pour extraire le chromogène de Zimmermann. L'inconvénient de ce solvant est la formation de turbulence lors du transvasage dans la cuve de mesure. L'addition de quelques gouttes d'alcool peut empêcher cette formation. Personnellement, nous avons constaté que l'addition de l'alcool n'est pas nécessaire si le transvasage de la phase colorée se fait avec douceur au moyen d'une pipette Pasteur.

L'avantage de ce solvant est la stabilité de la couleur dans le temps. La diminution de l'intensité colorée est inférieure à 3% en 60 minutes (50).

3) Effet de la formaldéhyde sur la diminution du taux des pigments

Dans le but de diminuer la formation des pigments au cours de l'hydrolyse acide, Autune (93) a proposé l'addition de la formaldéhyde à l'urine avant de commencer l'hydrolyse. La formation de pigments diminue effectivement. Nous l'avons constaté au cours de nos essais préliminaires. Goldzieher a étudié en détail ce problème. Il en a conclu que l'utilisation de la formaldéhyde n'est pas à conseiller, car tout en diminuant la formation de pigment, accélère la destruction de la DHA. D'autre part, il y a une diminution dans la récupération des 17-oxo-stéroïdes avec la formaldéhyde (37).

Spécificité de la réaction de Zimmermann

La réaction de Zimmermann n'est pas spécifique des 17-oxo-stéroïdes. Le MDB, en milieu alcalin, réagit avec d'autres stéroïdes ayant des fonctions cétoniques sur C_3, C_{11} et C_{20}. La coloration développée par ces stéroïdes a parfois un maximum d'absorption proche de 520 nm. Les 3-oxo-stéroïdes, par exemple, absorbent à 420 nm. C'est une source d'interférence faible (94). Par contre, les 20-oxo-stéroïdes absorbent à 490 nm et forment une source d'erreur assez importante dans la mesure absorptiométrique (6). Malgré ces

absorptions parasites, le résultat final ne change pas, car la présence de ces stéroïdes dans l'urine est relativement faible, par rapport aux métabolites avec des fonctions cétoniques en C_{17}.

c) Autres méthodes de la réaction de Zimmermann

Ces méthodes ne diffèrent pas beaucoup de celles de Callow et de Holtroff et Koch. Certains auteurs préconisent le remplacement de KOH minéral par une base organique telles que le tétramethylammonium hydroxyde (91) et le benzyltrimethylammonium hydroxyde (95). L'avantage de ces bases est leur stabilité dans le temps et l'absorption faible du témoin "réactifs".

II. Réaction de Pinkus (96)

Nous donnons simplement le principe de la réaction qui est basé sur le fait que le trichlorure d'antimoine dans un mélange d'acide acétique et d'anhydride acétique réagit avec les 17-oxo-stéroïdes saturés (20 minutes à 100°C) et donne une coloration bleue dont le maximum d'absorption est à 610 nm.

La DHA ne réagit pas n'étant pas saturée.

2.4.2. Dosage par polarographie

Ce dosage a été décrit et utilisé par plusieurs auteurs. Nous-mêmes ne l'avons pas étudié (voir réf. 9, Tome I, p. 95).

2.4.3. Dosage par chromatographie en phase gazeuse

Cette méthode, que nous avons étudiée et utilisée, sera décrite plus loin en détail dans un chapitre spécial.

3° Recherche d'une méthode appropriée au problème posé

3.1. Recherches sur diverses méthodes physico-chimiques

3.1.1. Méthode colorimétrique de dosage des 17-oxo-stéroïdes : réaction de Zimmermann selon Corker et Norymberski

Malgré le progrès réalisé au cours de ces dernières années dans le dosage des 17-oxo-stéroïdes au moyen de la chromatographie en phase gazeuse, la réaction colorimétrique de Zimmermann, qui est moins spécifique, reste néanmoins encore nécessaire à l'appréciation du taux global de ces hormones.

Parmi les différentes modalités examinées de cette réaction, notre choix s'est finalement fixé sur une modalité publiée par Corker et Norymberski, en 1962 (95)

En réalité, nous avons fixé notre choix sur cette méthode à cause de la limite de sensibilité que les auteurs lui accordaient. Nous l'avons adoptée et nous en avons étudié les paramètres les plus importants, ceci dans le but de l'employer ultérieurement dans une éventuelle détermination des 17-oxo-stéroïdes de l'urine de souris.

I. Matériel et méthode

I.1. Matériel et réactifs :

1. Métadinitrobenzène (Merck)
2. Benzyltriméthylammoniumhydroxyde à 40% aqueux (B.D.H)
3. Alcool absolu (Merck)
4. Déhydroépiandrostérone (Ikapharm) 100 µg/ml alcool
5. Spectrophotomètre DBGT (Beckmann)
6. Tubes à essais avec bouchons rodés

I.2. Méthode :

Des concentrations variables de la solution standard de DHA sont prélevées au moyen d'une seringue Hamilton (1-5µg). Le volume final est ajusté à 0,05 ml avec l'acool absolu.

A chaque concentration on ajoute :

- 0,1 ml de MDB à n% alcoolique (n= 0,5; 1,0;, 2,0)
- n ml de BTMH à 40% aq. (n= 0,05; 0,10; 0,15; 0,20)

Après une incubation à 25°C pendant n minutes (n = 60; 90; 120) et à l'obscurité, la réaction colorée est diluée avec l'alcool absolu de telle façon à avoir un volume final de 1,20 ml.

La lecture spectrophotométrique se fait dans des microcellules à 460, 520 et 580 nm contre un blanc-réactifs dans lequel la DHA est remplacée par 0,05 ml d'alcool.

La correction d'Allen est appliquée selon la formule :

$$D.O_{\text{corrigée}} = 2\ D.O_{520} - (D.O_{460} + D.O_{480})$$

Pour chaque quantité de DHA, nous avons fait huit à 12 essais.

II. Etudes détaillées de la méthode :

a) effet de la concentration en métadinitro-benzène

DHA (µg)	MDB à 0,5%			MDB à 1,0%			MDB à 2,0%		
	$D.O_c$	S.D	R	$D.O_c$	S.D	R	$D.O_c$	S.D	R
1	46	7	46	59	9	59	63	4	63
2	100	15	50	126	14	63	140	8	70
3	145	5	48	196	9	65	210	9	70
4	195	23	49	258	17	65	290	15	72
5	255	14	51	331	38	66	368	18	74

Tableau I.1 : Variation de la D.O 10^3 d'une solution standard de DHA en fonction de différentes concentrations de MDB alcoolique. "Réaction de Zimmermann : 0,05 ml standard + 0,1 ml MDB à n% + 0,05 ml de BTMH à 40% aq. 90 min. à 25°C
R = $D.O_c$/ concentration
S.D = écart-type

Du tableau I.1 (voir fig. I.1.), on constate que la D.O est fonction de l'augmentation de la concentration en MDB et évidemment de la quantité de DHA.

Entre la série MDB 0,5% et 1,0%, l'augmentation de la D.O est de 23%.

Par contre, la comparaison des séries MDB 1,0 et 2,0% donne une différence de l'ordre de 9%. Malgré la plus grande sensibilité de la méthode pour une concentration de MDB de 2%, nous conseillons l'utilisation de la concentration de MDB à 1% alcoolique, ceci pour des raisons de pratique. En effet, le MDB à 2% se recristallise à froid (glacière) et sa redissolution à la température ambiante prend généralement un certain temps. Une telle observation n'a pas été constatée avec le MDB à 1%.

b) Effet du volume de benzyltriméthylammonium hydroxyde (BTMH) à 40% aqueux.

DHA (µg)	(0,05 ml)			(0,10 ml)			(0,15 ml)			(0,20 ml)		
	$D.O_c$	S.D	R	$D.O_c$	S.D	R	$D.O_c$	S.D	R	$D.O_c$	S.D	R
1	59	9	59	78	19	78	94	11	94	65	--*)	65
2	126	14	63	150	22	75	178	27	89	162	--	81
3	196	9	65	217	17	72	250	12	83	220	--	73
4	258	17	65	289	18	72	338	11	84	315	--	79
5	331	38	66	371	18	74	394	21	79	392	--	78

*) Un calcul de la déviation standard n'a pas été fait en raison du nombre restreint des essais

Tableau I.2 : Variation de la D.O 10^3 d'une solution standard de DHA en fonction de différents volumes de BTMH 40% aq. "Réaction de Zimmermann : 0,05 ml de standard + 0,10 ml MDB à 1% + n ml de BTMH 40% aq. 90 minutes à l'obscurité et à 25°C "
R - $D.O_c$ / concentration
S.D - déviation standard

L'intensité de la réaction colorée augmente avec l'augmentation du volume de BTMH ajouté. Cependant, avec des volumes supérieurs à 0,1 ml, la linéarité devient moins bonne. Le témoin "réactifs" augmente de valeur également.

On note qu'avec 0,2 ml de BTMH, la courbe se situe entre les valeurs obtenues avec 0,10 et 0,15 ml. Il semble que l'augmentation de la quantité de BTMH au-delà de 0,15 ml n'augmente plus la sensibilité de la méthode (voir fig. I.2)

En accord avec Corker et Norymberski, la quantité idéale de BTMH à utiliser est 0,05 ml (ou 0,1 ml lorsque le domaine de concentration est inférieur à 1µg). Il est à noter que la différence de la D.O entre 0,05 ml et 0,10 ml de BTMH n'est que de 14,4%.

c) Effet du temps d'incubation

Temps d'incubation par minute

DHA (µg)	60 minutes			90 minutes			120 minutes		
	$D.O_c$	S.D	R	$D.O_c$	S.D	R	$D.O_c$	S.D	R
1	60	00	60	57	8	57	48	17	48
2	110	9	55	124	15	62	137	13	69
3	178	6	59	193	10	64	192	12	64
4	228	20	57	255	20	64	280	00	70
5	308	24	61	331	38	66	312	23	62

Tableau I.3 : Variation de la D.O d'une solution standard de DHA en fonction du temps d'incubation. "Réaction de Zimmermann : 0,05 ml standard + 0,10 ml MDB 1% + 0,05 ml BTMH 40% "
R - $D.O_c$ /concentration

Il ressort du tableau I.3 que les temps d'incubation choisis n'entraînent pas de différences significatives entre eux.

d) Effet de la dilution finale de la réaction colorée

Jayle a déconseillé la dilution de la solution colorée finale, ceci dans le cas d'une réaction de Zimmermann qui emploie le KOH éthanolique (9). Il nous a paru nécessaire de vérifier les observations de Jayle dans notre cas où l'on emploie comme base le BTMH à 40% aqueux.

Plusieurs lots de DHA (5µg) sont incubés selon la méthode. La solution colorée finale est diluée, juste avant la lecture spectrophotométrique, avec des différents volumes d'alcool absolu.

Dilution (ml) alcool absolu	$D.O_{corrigée}$	$R = D.O_c$ x vol. final
0,5	320 ± 7	225
1,0	173 ± 5	208
2,0	96 ± 6	211
3,0	65 ± 0	208

Tableau I.4 : Variation de la D.O 10^3 d'une concentration donnée de DHA, en fonction de la dilution finale de la réaction colorée.

En ramenant les valeurs de la D.O à un rapport constant, on constate que ce dernier ne varie pas beaucoup d'une dilution à une autre ($\bar{X}$ = 0,213 ± 0,008). Donc la dilution de la réaction colorée n'entraîne pas d'erreur de lecture. Ceci nous sert dans le cas où lors d'une mesure quelconque d'un extrait urinaire, si la valeur de la D.O de l'extrait est trop élevée, on peut diluer la phase finale de telle manière à ce que la valeur de D.O se trouve dans les limites de la courbe standard.

e) Effet de la lumière

Pour évaluer cet effet sur l'ensemble de la méthode, nous avons réalisé 2 séries de recherches en pratiquant

l'entier des manipulations au jour et dans l'obscurité.

DHA (µg)	$D.O_{corr.}$ (lumière)	$D.O_{corr.}$ (obscurité)	Student (t)
1	45 ± 7	59 ± 9	2,89 (n=12)
3	166 ± 6	196 ± 9	6,52 (n=12)
5	262 ± 10	331 ± 38	6,22 (n=12)

Tableau I.5 : Effet de la lumière sur la réaction de Zimmermann. Les valeurs représentent les D.O 10^3.

La lumière influence nettement la bonne marche de la réaction; les tests t de Student sont significatifs dans les 3 séries d'essais. L'intensité de la coloration est plus faible à la lumière qu'à l'obscurité. Cette constatation est déjà connue et nos résultats ne font que de la confirmer.

f) Sensibilité de la méthode

Afin de voir jusqu'à quelle limite cette méthode permet de doser les 17-oxo-stéroïdes, nous avons dilué la solution standard de DHA 10 fois. Nous avons refait la courbe standard avec des gammes de concentrations de 0,2 - 1,0µg au moyen d'une seringue Hamilton. Le dosage s'est porté sur 8 essais pour chaque point.

Solution standard : 0,10 ml vol. final à n µg de DHA
MDB 1% : 0,10 ml
BTMH 40% : 0,10 ml

90 minutes à l'obscurité et à 25°C. Dilution finale avec 0,5 ml d'alcool.

DHA (µg)	$D.O_{corrigée}$	R = $D.O_c$ /concentration
0,2	26 ± 16	130
0,4	38 ± 7	95
0,6	55 ± 8	92
0,8	75 ± 7	94
1,0	96 ± 12	96

Tableau I.6 : Sensibilité de la méthode. Variation de la D.O d'une solution standard de DHA. Les valeurs indiquées de la D.O doivent être divisées par 2, la sensibilité du spectrophotomètre ayant été multipliée par 2.

La figure I.3, ainsi que le tableau VI, nous montrent que la méthode en question permet le dosage de quantités inférieures à 1µg de DHA pure. La linéarité est bonne à partir de 0,4 µg. Cependant, il faut signaler qu'il est important d'utiliser un appareil de mesure de haute sensibilité afin d'assurer une telle linéarité. La quantité de BTMH doit également être doublée.

g) Application de la méthode sur l'urine humaine

Dans le but de tester la reproductibilité de la méthode, nous l'avons essayée dans la détermination de 4 extraits urinaires d'une même urine et dosés à divers moments.

Les extraits urinaires ont été préparés par une hydrolyse acide comme suit : 5 ml d'urine sont hydrolysés avec HCl conc. (3 vol./10 vol. urine) en plongeant l'urine dans l'eau en ébullition pendant exactement 10 minutes. 0,2 ml de la formaldéhyde à 8% /10 ml urine sont ajoutés avant l'hydrolyse.

Après refroidissement, l'urine est extraite en une seule extraction (15') avec un mélange de benzène : éther de pétrole (1:1), (5 vol./vol. urine) (50).

La phase organique (25 ml) est lavée en présence de 15-20 pastilles de NaOH (72)(41) pendant 15 minutes, puis filtrée sur Whatmann 1.

2 ml de la phase organique sont prélevés et évaporés à sec (45℃) pour le dosage colorimétrique.

Expérience	µg 17-oxo-stéroïdes / 1000 ml urine
1	8,98
2	8,78
3	9.19
4	8,70
$\bar{X}$ ± S.D	8,91± 0,22
Précision : S.D / $\bar{X}$	2,5 %

Tableau I.7 : Reproductibilité de la méthode. Chaque valeur correspond à la moyenne de 3-6 déterminations colorimétriques.

Dans son application à l'urine humaine et compte tenu des conditions dans lesquelles nous avons utilisé la méthode de Corker et Norymberski, on constate une très bonne reproductibilité.

III. Discussion

La détermination des principaux paramètres de la micro-réaction de Zimmermann, selon les modalités décrites, nous permet de tirer les conclusions suivantes : cette micro-méthode présente une très bonne reproductibilité dans les limites de concentrations de 0,4 - 5 µg. Nous n'avons pas essayé de pousser les investigations au-delà de 5µg afin de contrôler le point d'inflexion des courbes de DO en fonction de la concentration. Cependant, nous pensons qu'elle ne se modifie pas jusqu'à 50-60µg. Corker et Norymberski (95) indiquent dans leur travail une plage de 3-20µg de DHA.

La méthode offre l'avantage sur les autres méthodes d'être sensible. Elle permet en effet de déterminer des quantités inférieures à 1µg de DHA. A titre de comparaison, les deux principales modifications de la réaction de Zimmermann, celle de Callow et coll. (87) et celle de Holtroff et Koch (88), employant du KOH éthanolique et

aqueux respectivement, ne paraissent sensibles qu'à partir de 2-2,5 µg de DHA.

L'emploi du BTMH à 40% aqueux a ses avantages : c'est une base organique très stable dans le temps. A ce sujet, nous avons travaillé avec le même lot de BTMH 40% pendant des mois sans noter de changements importants dans la valeur de la D.O. Par comparaison, l'emploi du KOH éthanolique (modification de Callow) qui, malgré les modes de préparation proposés pour augmenter sa stabilité, ne se conserve que quelques jours à la glacière.

Un autre avantage du BTMH 40% est la faible D.O du témoin "réactifs" qu'il donne avec le MDB éthanolique. Elle est nettement inférieure à celle du KOH éthanolique, mais reste supérieure à celle du KOH 5N aqueux.

3.1.2. Recherche d'un système de séparation des principaux métabolites des 17-oxo-stéroïdes dans l'urine humaine par chromatographie sur couche mince (CCM)

C'est grâce à Stahl, en 1956, que la chromatographie sur couche mince a fait son apparition dans le domaine de la recherche. Son application en hormonologie a commencé peu de temps plus tard comme méthode simple et élégante de purification et de séparation des hormones stéroïdes (97-107). Son avantage sur la chromatographie sur colonne ou sur papier est la rapidité de son exécution, la facilité de sa manipulation et la possibilité de révélation avec des révélateurs corrosifs, comme l'acide sulfurique. Elle offre, de plus, par rapport à la chromatographie sur papier, l'avantage d'une grande sensibilité.

La CCM est une chromatographie d'adsorption basée sur le principe de séparation des constituants grâce à leurs groupements fonctionnels (-OH; C=C; CH_3, etc.) La phase stationnaire est formée par l'adsorbant sur lequel l'échantillon à analyser est déposé. La phase mobile est formée par le solvant (ou un mélange de solvants) qui avec sa montée entraîne les différents composants d'un mélange. Dans le domaine de l'analyse hormonale, plusieurs méthodes de séparation ont été proposées employant différents types d'adsorbants et différents systèmes de solvants (100)(108)(76

Parmi les différents procédés de séparation examinés, nous avons retenu celui de Leluan et Gairard (79)(78) qui emploient des plaques de silica-gel dans un système de solvants chloroforme : éthanol (98:2).

Ce mélange permet de séparer effectivement les principaux métabolites urinaires humains des 17-oxo-stéroïdes en zones distinctes à condition de respecter les données de ces auteurs.

Nous avons essayé cette méthode et nous l'avons adoptée afin de répondre à la question que nous nous sommes posés au début de ce chapitre.

I. Matériel et méthode :

I.1. Matériel et réactifs :

1. Equipement complet de chromatographie sur couche mince (Camag). L'étaleur des plaques est de la firme Shandon.
2. Silica-gel DF/5 (Camag). Le silica-gel Merck G selon Stah 254 peut aussi être employé.
3. Seringue Hamilton de 50µl.
4. Chloroforme p.a. distillé et stabilisé avec 1% d'éthanol (Merck).
5. Ethanol p.a. (Merck). Distillé.
6. Métadinitrobenzène à 1% éthanolique (B.D.H.)
7. KOH éthanolique à 20% env. (Merck)
8. H_2SO_4 50% méthanolique (Merck)
9. Ac. phosphomolybdique à 30% éthanolique (Merck).
10. Stéroïdes de référence (1µg/ 1µl) :
    - Androstérone (5α-Androstane-3α-hydroxy-17-One)
    - Etiocholanolone (5β-Androstane-3-α-hydroxy-17-One)
    - Déhydroépiandrostérone (5α-Androstène-3β-Hydroxy-17-One)
    - 11-oxo-Androstérone (5α-Androstane-3α-hydroxy-11, 17-Dione)

- 11β-OH-Androstérone (5α-Androstane-3α,11β-dihydroxy-17-One)
- 11β-OH-Etiocholanolone (5β-Androstane-3α,11β-dihydroxy-17-One)

Les stéroïdes sont fournis par Ikapharm.

I.2. Méthode :

a) Préparation des plaques

Des plaques de verre de 20x20 cm sont lavées à l'eau, séchées et rincées à l'acétone. Une suspension de silicagel (25g /50ml H_2O déminéralisée) est préparée de préférence dans un ballon de 250 ml à fond rond. Après une forte agitation (2-3 minutes), la suspension est versée dans le réservoir de l'étaleur et les plaques sont immédiatement étalées en couche de 0,25 - 0,30 mm d'adsorbant.

Les plaques sont laissées pendant 30 minutes à l'air libre, puis activées pendant 2h. à 110°C.

Si les plaques sont utilisées pour une analyse quantitative, il est préférable de les purifier par développement 2-3 fois dans une cuve contenant du méthanol. Elles sont de nouveau activées à 110°C pendant 1h.

b) Développement des plaques

L'échantillon est déposé au moyen d'une seringue Hamilton sous forme de traits de 2 cm de largeur à 2 cm du bord inférieur de la plaque. La diffusion des traits est limitée par séchage continu au moyen d'un courant d'air chaud. (Il existe actuellement dans le commerce des applicateurs de l'échantillon linéaire. Nous avons essayé un de ces applicateurs. Il convient, à notre avis, pour la chromatographie sur couche mince préparative mais pas pour l'analyse quantitative).

La plaque est ensuite développée dans une cuve saturée contenant un mélange de chloroforme :éthanol (98:2). La saturation de la cuve est assurée par un papier filtre Whatmann qui entoure les parois internes de la cuve. Le

temps de saturation est de 4h.

Le développement de la plaque se fait en plusieurs fois : 1x30 minute et 3x 45 minutes. La plaque est séchée à l'air pendant 5 minutes entre chaque développement. Les spots sont révélés par pulvérisation du MDB à 1%, puis KOH à 20% éthanolique. Une coloration pourpre caractéristique des 17-oxo-stéroïdes apparaît immédiatement. Dans certains cas, on peut révéler les spots avec l'acide sulfurique à 50% méthanolique ou l'acide phosphomolybdique à 30% éthanolique en chauffant la plaque pendant 15-20 minutes à 110°C.

Il est important de pulvériser les révélateurs d'une façon uniforme. A ce sujet, nous avons trouvé que le moyen le plus efficace est de connecter le vaporisateur à un courant d'azote ou d'air comprimé.

c) Elution des spots

Les spots sont grattés avec une spatule. L'adsorbant est acheminé vers le bord de la plaque dans des tubes à centrifuger de 15 ml. L'élution est faite avec 3 x 2 ml d'éthanol, en agitant les tubes à chaque fois (vortex) pendant une minute.

Les tubes sont centrifugés (3000 t/m) pendant 10 minutes. Le surnageant est transvasé dans un second tube, au moyen d'une pipette Pasteur et évaporé à sec.

Parallèlement, une zone de silice équivalente à un spot est grattée. Elle est éluée en même temps que les spots colorés et constitue le blanc-CCM.

II. Résultats

Une séparation type des 17-oxo-stéroïdes est représentée sur le chromatogramme (fig. I.4). On remarque que les $C_{19}O_2$ (androstérone, étiocholanolone, DHA) sont nettement

séparés des $C_{19}O_3$ (11-oxo-A; 11-oxo-E; 11β-OH-A; 11β-OH-E).

L'androstérone se sépare bien de la DHA. Ces deux stéroïdes sont généralement difficilement séparables dans les autres systèmes (76)(68)(100)(107). Par exemple, ni le cyclo-hexane : acétate d'éthyle (1:1), ni le benzène-acétate d'éthyle (1:1) les séparent. La 11-oxo-androstérone est également bien séparée de la 11-oxo-étiocholanolone.

Par contre, les formes hydroxylées de l'androstérone et de l'étiocholanolone sont plus ou moins bien séparées. A notre avis, cette séparation incomplète reste suffisante pour une éventuelle détermination quantitative.

II.1. Reproductibilité des Rf relatifs.

Comme il s'agit d'une chromatographie à développements multiples, il est difficile de mesurer un Rf correctement. Nous avons donc mesuré un Rf relatif par rapport à l'androstérone qui migre généralement en tête (voir fig. I.4)

Andro	DHA	Etio	11-oxo-A	11-oxo-Etio	11β-OH-A	11β-OH-Etio
1	0.91	0.81	0.59	0.46	0.33	0.27
1	0.92	0.81	0.60	0.47	0.35	0.29
1	0.93	0.81	0.61	0.47	0.34	0.26
1	0.94	0.84	0.62	0.51	0.32	0.26
1	0.93	0.83	0.62	0.51	0.34	0.30
1	0.92	0.80	0.59	0.48	0.36	0.27
1	0.93	0.83	0.61	0.52	0.32	0.28
$\bar{X}$	0.93	0.82	0.60	0.49	0.34	0.28

Tableau I.8 : Reproductibilité des Rf relatifs (Rf androstérone = 1,0) des $C_{19}O_2$ + $C_{19}O_3$ sur CCM dans un système $CHCl_3$ éthanol (98:2) à développements multiples (1 x 30', 3 x 45')

II.2. Taux de récupération des substances séparées

Deux procédés d'élution des stéroïdes de référence, préalablement déposés sur une plaque de silica-gel, sont employés.

Le premier consiste à déposer 50µ de DHA sur la plaque, de la développer et de la révéler avec l'acide phosphomolybdique à 30% éthanolique (20' à 110°C). Il nous est apparu que la réaction colorimétrique à l'acide phosphomolybdique ne gênait pas le développement de la réaction de Zimmermann après que le spot ait été gratté et élué.

L'élution est faite avec l'éthanol (voir méthode). La mesure colorimétrique est faite par la réaction de Zimmermann selon la modalité de Peterson (extraction du chromogène final par le dichlorométhane) (50).

ml d'éthanol (éluant)	Récupération en %	S.D.	Précision
1 x 2 ml	71,6%	3,2 %	4,5 %
2 x 2 ml	78,4%	4,4 %	5,6 %
3 x 2 ml	78,8%	4,8 %	6,1 %
4 x 2 ml	77,2%	5,3 %	6,9 %

Tableau I.9 : Récupération de la DHA (50 µg) déposé sur une plaque de CCM (Silica-gel) et éluée par différents volumes d'éthanol.

Le tableau I.9 montre qu'avec 3 x 2 ml d'éthanol on arrive à récupérer environ le 80% de la DHA déposée. Starka en utilisant le même éluant (4 x) trouve des valeurs de 1 ordre de 82,3% pour 20 µg de DHA et 78,4% pour 40 µg de DHA (100).

Avec le second procédé, nous avons effectué la réaction colorimétrique de Zimmermann directement sur l'adsorbant en doublant les volumes des réactifs. La coloration selon ce procédé se développe parfaitement bien. Nous avons remarqué que lors de l'extraction du chromogène par le

dichlorométhane, les deux couches se séparaient plus rapidement en présence du silica-gel que dans le cas normal.

Le tableau I.10 montre la récupération de la même quantité de DHA par ce procédé.

Stéroïde	Récupération	S.D.	Précision
DHA	72,7 %	9,8 %	13,5 %
Androstérone	72,0 %	13,2 %	18,3 %
Etiocholanolone	62,4 %	7,4 %	11,8 %

Tableau I.10 : Récupération de la DHA (50 µg) déposée sur une plaque de CCM (Silica-gel). Réaction colorimétrique est faite directement sur l'adsorbant.

L'examen des résultats montre que le taux de récupération du second procédé est inférieur à celui du premier. Cette constatation confirme celle de Leluan et Gairard (78-79) qui trouvent également une baisse de la récupération lorsque la réaction colorimétrique est effectuée directement sur l'adsorbant.

III. Discussion

La chromatographie sur couche mince à développements multiples des sept métabolites urinaires des 17-oxo-stéroïdes dans un système de chloroforme :éthanol (98:2) offre l'avantage de les séparer en fractions distinctes. L'une des conditions les plus importantes pour assurer une telle séparation est la saturation dans la cuve (plus de 4h.). La séparation est moins bonne avec des cuves saturées pendant 1, 2 et 3h. D'autre part, le nombre de développements doit être respecté. Nous avons essayé de diminuer ce nombre en 1 x 30 minutes et 2 x 45 minutes, mais la séparation était moins bonne.

La récupération d'une prise de DHA (50 µg), selon les procédés indiqués, nous paraît faible. Comme le taux de récupération dépend de l'éluant, de la nature de l'adsorbant et de l'affinité adsorbant-stéroïdes, il peut éventuellement être amélioré. Mais étant donné que notre but pour le moment se limite à rechercher un bon système de séparation chromatographique, nous avons laissé ce problème de côté en nous contentant du taux obtenu dans nos résultats.

3.1.3. Recherche d'un système de séparation de stéroïdes urinaires par chromatographie en phase gazeuse

Les premiers travaux sur la chromatographie en phase gazeuse remontent à l'année 1952 où Martin and James décrirent une méthode de séparation des acides gras et discutèrent les bases théoriques de cette technique (109) (110).

Dès lors, cette méthode a été largement appliquée dans différents domaines analytiques et spécialement pour la séparation et le dosage des stéroïdes humains (111-121). Son application à l'étude des stéroïdes chez les animaux a fait l'objet également de plusieurs travaux (51) (10-19).

Pour nos travaux et dans un premier temps, nous avons établi les conditions d'analyse (de notre laboratoire) qui nous ont permis d'obtenir une bonne séparation des principaux métabolites urinaires humains des 17-oxo-stéroïdes.

Dans un second temps, nous avons appliqué cette méthode à l'analyse des stéroïdes urinaires chez la souris.

Nous nous limiterons dans ce chapitre à la description des conditions opératoires de l'analyse par CPG que nous avons employées.

I. Matériel et méthode :

I.1. matériel et réactifs

- Chromatographe : Fractovap Carlo-Erba, muni de deux colonnes et deux détecteurs à ionisation de flamme (FID).
- Colonnes en verre : 180 x 0,3 ou 0,4 cm
- Supports et phases stationnaires :
  1. OV-225 à 3% sur Gas Chrom Q; 100/120 mesh. (Applied science Laboratories Inc. U.S.A.)
  2. OV-17 à 3% sur Gas Chrom; 100/120 mesh. (Applied Science Laboratories Inc. U.S.A.)
  3. OV-1 à 3% sur Suppelcoport; 100/120 mesh. (Supelco Inc.)
- Seringue Hamilton : 10 µl de capacité
- Laine de verre sylanisée
- Tubes à fond conique en verre, ballons forme coeur.

- HMDS (hexaméthyldisilazane) Fluka.
- DMCS (dichlorodiméthylsilane) Fluka
- BSTFA (bis(triméthysilyl) trifluoroacétamide) Serva.
- DMF (diméthylformamide) pour CPG. Pierce Chemical Co USA.
- Toluène p.a. Merck
- Chloroforme p.a. Merck
- Ethanol p.a. Merk
- Méthanol p.a. Merck

Tous les solvants sont distillés avant l'emploi.

I. 2. Méthode

I.2.1. Préparation de la colonne :

a) Silylation du verre :

La colonne de chromatographie est lavée, séchée à 120°C pendant 1h. Elle est ensuite sylanisée par simple remplissage avec une solution de DMCS à 10% dans du toluène pendant 1h.

Après plusieurs rinçages au toluène et au chloroforme successivement, elle est rincée au méthanol et de nouveau séchée pendant 1h. à 120°C.

b) Remplissage du support imprégné de la phase stationnaires :

La colonne est reliée par l'une de ses extrémités à une trompe à vide, le support imprégné de la phase stationnaire est versé à l'autre extrémité de la colonne au moyen d'un petit entonnoir (voir schéma).

c) conditionnement de la colonne :

1) conditionnement à haute température

Généralement, chaque colonne est conditionnée par chauffage dans le chromatographe à une température inférieure à la température maximale de la phase stationnaire de 20°C, ceci pendant 24h. Ensuite, on poursuit le chauffage à la température de l'utilisation pendant 12-24h. Pendant ce temps, on injecte plusieurs fois de l'HMDS (10 µl), ceci afin de bloquer tout site d'adsorption.

2) efficacité de la colonne

L'efficacité de la colonne est définie par le nombre des plateaux théoriques.
Les colonnes employées pour la séparation et le dosage des stéroïdes dans nos travaux ont 2400 à 2600 plateaux théoriques, calculés d'après la relation :

$$n = 16 \left(\frac{T_R}{X} \right) \quad (122)$$

T_R = temps de rétention
X = largeur du pic à la base de l'étiocholanolome

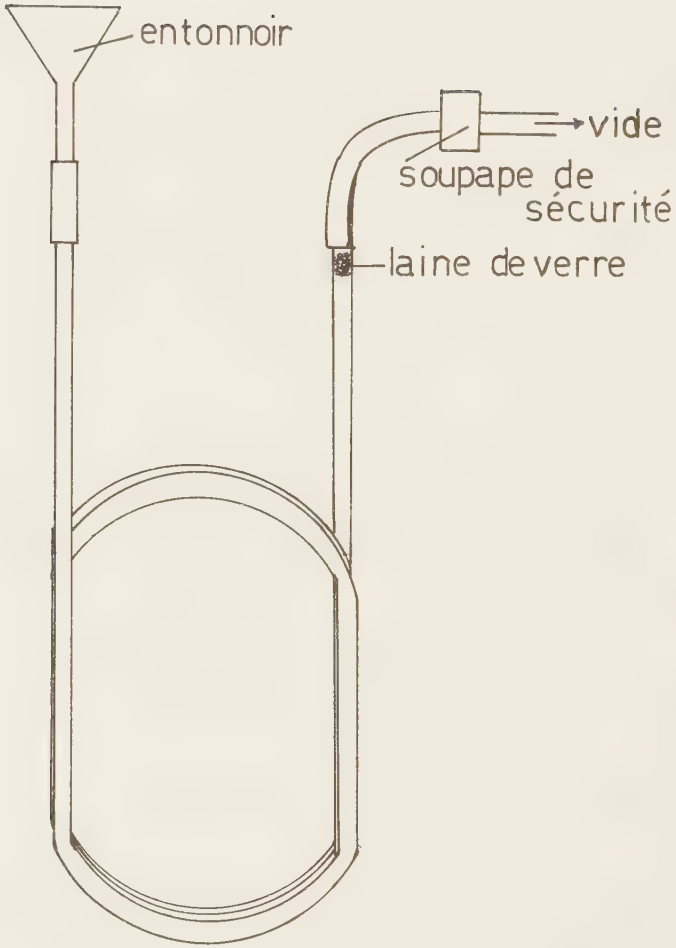


Schéma de remplissage d'une colonne

ceci par rapport au pic de l'étiocholanolone mesuré à 220 °C.

D'une manière générale, on estime que pour une séparation des stéroïdes, le nombre de plateaux théoriques ne doit pas être inférieur à 1500.

3) détermination du débit optimal du gaz porteur

Pour chaque colonne de chromatographie en phase gazeuse correspond un débit optimal de gaz porteur (efficacité maximale de la colonne).

Nous avons déterminé les débits optima de nos colonnes selon la méthode décrite par Tranchant (122)

1.2.2. Préparation des dérivés TMSi (triméthylsilyléther) de stéroïdes de référence

Le but de la transformation en dérivés-TMSi des stéroïdes est de rendre la molécule plus volatile et moins polaire. L'action des produits de silylation se situe au niveau du groupement -OH de la molécule.

Les agents de silylation les plus employés sont :
- l'HMDS (hexaméthyldisilazane)
- le BSA (N,O-bis (triméthylsilyl) acétamide)
- le BSTFA (N,O-bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide).

Nous avons préparé nos stéroïdes-TMSi de référence, par évaporation d'aliquotes alcooliques de stéroïdes. Le résidu est repris dans un volume de BSTFA de telle façon à avoir 0,25-0,50 µg/µl de BSTFA.

La réaction de transformation est complétée, soit par incubation à 60°C pendant 1h., soit par incubation toute la nuit à la température ambiante.

Il est à noter que dans ces conditions de silylation, (BSTFA seul) les groupements -OH en position 11β et 17α ne sont pas touchés (111).

1.2.3. Analyse qualitative

L'analyse qualitative des pics est déterminée par l'emploi de deux critères :

a) critère de temps de rétention relatif (T_{RR})

On définit le T_{RR} comme le rapport entre le temps de rétention d'un soluté A (T_RA) et le temps de rétention d'un composé de référence X (T_RX) :

$$T_{RR} = \frac{T_RA}{T_RX}$$

La référence employée est généralement le 5α-cholestane.

Le temps de rétention relatif est caractéristique d'une substance donnée, mais il est important de noter que plusieurs substances peuvent avoir le même temps de rétention relatif, sur une phase donnée. L'inconvénient de ce critère est sa dépendance de la température de la colonne.

b) critère du nombre stéroïdique (N.S) de Vandenheuvel (123)

Vandenheuvel et Horning, en 1962, et Hamilton, en 1963, (123)(124) décrirent un critère de mesure qualitative des stéroïdes moins dépendant de la température que le temps de rétention relatif, ceci lorsqu'on travaille à une température isotherme.

Si on porte sur une échelle logarithmique le temps de rétention relatif de stéroïdes en fonction du nombre de leurs atomes de carbone, on obtient une ligne droite. La variation de cette droite à différentes températures est très petite (fig. I.6). En pratique, on choisit le 5α-cholestane (27C), le 5α-pregnane (21C) et le 5α-androstane (19C) pour tracer la droite qui permet de calculer le nombre stéroïdique.

1.2.4. Analyse quantitative

L'analyse quantitative a été effectuée par injection de volumes déterminés (1-2 µl) des substances à analyser. La surface des pics est calculée par la relation : "hauteur de pix x largeur à mi-hauteur".

La quantification d'un composé a été faite par rapport à un standard externe.

II. Résultats :

a) Etude de la linéarité de la réponse du détecteur

Nous avons déterminé la linéarité de la réponse du détecteur par injections de quantités croissantes des 17-oxo-stéroïdes-TMSi de référence.

Les résultats sont portés dans les tableaux (I.11 et I.12). On constate que pour tous les stéroïdes analysés, la réponse du détecteur est linéaire entre 0,2 et 0,7 µg.

b) Précision de la mesure en chromatographie en phase gazeuse

La littérature donne généralement une précision de la mesure en CPG de l'ordre de 5% (125)(126). En réalité, cette précision dépend de plusieurs facteurs; opérateur, type de chromatographe, détecteur, type de seringue, mode d'injection, enregistreur et surtout la quantification au niveau du chromatogramme.

Il est à signaler que cette valeur de 5% ne tient pas compte de la perte ou de l'erreur due à la manipulation. Pour connaître la précision de notre mode de travail, nous avons injecté un mélange de stéroïdes de référence, sans arrêter ni le détecteur, ni le chromatographe. Les résultats du tableau (I.13) nous montrent que nous restons dans les limites de l'erreur citée ci-dessus.

Stéroïdes	surface (mm^2)	écart-type	précision
androstérone	282,3	14,5	5 %
étiocholanolone	162,3	7,8	5 %
DHA	143,3	5,2	4 %
11-oxo-androstérone	123,6	6,2	5 %
11-oxo-étiocholanolone	125,3	6,7	5 %
11βOH-androstérone	130,3	10,2	8 %
11βOH-étiocholanolone	108,6	5,0	5 %
pregnandiol	151,7	5,3	4 %
pregnantriol	120,0	7,2	6 %

Tableau I.12 : Précision de 5 injections successives des 17-oxo-stéroïdes, du pregnandiol et du pregnantriol de référence sans arrêter le chromatographe.
conditions : colonne OV-225 à 3%; température de la colonne : 222°C; température de l'injecteur: 270°C; détecteur H_2/air: 1,1/1,3 kg/cm^2; N_2 : 1,0 kg/cm^2; atténuation: 10 x 16.

c) Screening de stéroïdes de référence sur trois phases : OV-1 3%, OV-17 3%, OV-225 3%. Détermination du temps de rétention relatif par rapport au 5-α-cholestane et du nombre stéroïdien (N.S)

Nous décrirons ci-dessous les conditions opératoires que nous avons employées :

	OV-225	OV-17	OV-1
Longueur de la colonne	180 cm	180 cm	180 cm
Diamètre de la colonne	3 mm	4 mm	4 mm
Température du four	210 °C	210 °C	210 °C
Débit du gaz porteur	1,0kg/cm^2	1,0kg/cm^2	1,5kg/cm^2
Température de l'injecteur	270 °C	270 °C	270 °C
Débit de l'hydrogène	1,1kg/cm^2	1,0kg/cm^2	1,0kg/cm^2
Débit de l'air	1,3kg/cm^2	1,3kg/cm^2	1,3kg/cm^2
Atténuation	10 x 16	10 x 16	10 x 16
Vitesse de l'enregistreur	5 mm/min.	5 mm/min.	5 mm/min.

µg injectés	I		II		III		IV		V	
	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)
0,2	126,9	634,5	91,6	480,5	240,1	1200,5	132,5	662,5	116,1	580,5
0,3	187,2	624,0	142,5	475,0	350,4	1168,0	197,0	656,7	172,0	573,3
0,4	239,4	598,5	191,9	479,8	451,9	1129,8	246,8	617,0	222,8	557,0
0,5	295,9	591,8	239,0	478,0	548,0	1096,0	349,0	591,8	301,5	603,0
0,7	410,4	586,3	340,0	485,7	736,8	1052,6	442,0	631,4	384,0	548,6

I = Pregnandiol
II = Pregnantriol
III = Androstérone
IV = Etiocholanolone
V = Déhydroépiandrostérone
(S) = Surface en mm^2 ; (R) = rapport de surface/concentration en µg.

Tableau: Linéarité de la réponse du détecteur. "Conditions: OV-225 à 3% ; température de la colonne 22
I.11. Injecteur:270 ; N_2:1,0 kg/cm^2 ; H_2/air:1,1/1,3 kg/cm^2; atténuation: 10X16".

µg injectés	VI		VII		VIII		IX	
	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)
0,2	102,4	512,0	102,7	513,5	102,4	512,0	81,8	409,0
0,3	147,5	491,7	150,3	501,0	153,6	512,0	127,7	425,7
0,4	193,4	483,5	199,6	499,0	204,4	511,0	171,1	427,8
0,5	249,5	499,0	254,5	509,0	275,6	551,2	227,1	454,2
0,7	340,4	486,3	338,0	482,8	366,0	522,8	318,2	454,6

VI = 11-oxo-androstérone
VII = 11-oxo-étiocholanolone
VIII = 11BOH-androstérone
IX = 11BOH-étiocholanolone

(S) = surface en mm^2 ; (R) = rapport de surface/concentration en µg

Tableau I.12: Linéarité de la réponse du détecteur. "conditions: OV-225 à 3% ; température de la colonne: 222 C ; injecteur: 270 C ; N_2: 1 kg/cm^2 H_2/air : 1,1/1,3 kg/cm^2 ; atténuation: 10X16."

Les différents temps de rétention relatifs et les nombres stéroïdiens sont donnés dans les tableaux (I.14 et I.15).

d) Séparation d'un mélange standard des sept principaux métabolites des 17-oxo-stéroïdes, du pregnandiol et du pregnantriol de l'urine humaine.

Parmi les trois phases testées, nous avons retenu la phase OV-225 à 3% pour assurer une parfaite séparation des métabolites urinaires mentionnés ci-dessus à température isotherme. La figure (I.5) nous montre un chromatogramme type de cette séparation.

III. Discussion

Nous pouvons résumer l'essentiel de notre travail par la recherche de conditions les plus favorables pour assurer une séparation des principaux métabolites urinaires des 17-oxo-stéroïdes.

En se basant sur les observations et les essais que nous avons effectués, notre choix s'est fixé sur la colonne OV-225 à 3% pour une telle séparation.

En effet, cette colonne, et comme le montre la figure (I.5), en plus d'une bonne séparation des $C_{19}O_2$ et $C_{19}O_3$, sépare parfaitement bien les métabolites de la progestérone.

Comme nous le verrons plus loin, la séparation d'une urine humaine sur cette phase donne des résultats valables.

Si la colonne OV-225 sépare bien ces métabolites, par contre les deux autres colonnes OV-17 (moins polaire que OV-225) et OV-1 (apolaire) les séparent moins bien dans les conditions précitées, ceci à température isotherme (voir tableaux I.14 et I.15) pour comparaison du nombre stéroïdique. Mais l'avantage de l'utilisation de ces deux colonnes réside dans leurs propriétés sélectives de séparations bien connues. L'OV-17 sépare les substances d'après

leurs groupements fonctionnels, tandis que la seconde les sépare d'après leurs poids moléculaires (135).

La détermination du nombre stéroïdique d'une série de stéroïdes de référence sur les trois colonnes de polarités différentes a été faite dans le but d'identifier par la suite les stéroïdes urinaires de la souris, inconnus pour le moment.

Nous avons préféré l'utilisation de ce critère, défini par Vandenheuvel (123) à celui du temps de rétention relatif, à cause de ses faibles fluctuations en fonction de différentes conditions chromatographiques, débit de gaz, température, etc. qui peuvent varier d'une analyse à une autre.

La détermination de la précision de l'analyse ainsi que la linéarité de la réponse du détecteur pour des stéroïdes concernés ne fait que de confirmer les constations déjà faites dans la littérature(135)(125-126).

	(T_{RR})	(N.S)	(T_{RR})	(N.S)	(T_{RR})	(N.S)
5α-androstane	0.12	19.00	0.09	19.00	0.09	19.00
5α-androstane,17-one	0.61	25.10	0.26	22.55	0.18	21.30
5α-androstane,3,17-dione	4.89	32.95	0.75	26.05	0.39	23.90
5β-androstane,3,11,17-trione	2.20	29.90	1.33	28.00	0.42	24.15
5a-androstane,3α01,17-one (androstérone)	1.00	27.00	0.48	24.60	0.37	23.70
5α-androstane,3β01,17-one (épiandrostérone)	1.43	28.40	0.67	25.85	0.48	24.60
5α-androstane,3α,11β01,17-one (11βOH-androstérone)	3.22	31.40	1.09	27.35	0.62	25.40
5α-androstane,3α01,11,17-dione (11-oxo-androstérone)	2.41	30.25	0.81	26.30	0.47	24.50
5α-androstane,3β,11β-diol,17-one	3.86	32.00	1.18	27.60	0.64	25.60
5β-androstane,3,17-dione	4.53	32.70	0.87	26.65	0.35	23.60
5β-androstane,3α01,17-one (étiocholanolone)	1.18	27.60	0.53	24.90	0.39	23.90
5β-androstane,3α,11β-diol,17-one (11βOH-étiocholanolone)	3.95	32.20	1.22	27.70	0.64	25.60
5β-androstane,3α01,11,17-dione (11-oxo-étiocholanolone)	2.85	30.90	0.83	26.40	0.49	24.70
4-androstène,317-dione	7.54	34.50	1.10	27.35	0.48	24.60
4-androstène,1701,3-one (testosterone)	2.54	30.50	0.95	26.90	0.64	25.60

Tableau I.14 : Screening des stéroides de référence (TMSI) sur trois colonnes OV-225 3%, OV-17 3% et OV-1 3%. T_{RR} = temps de retention relatif (5α-cholestane = 1), N.S = nombre stéroidique.

	OV-225 3 %		OV-17 3 %		OV-1 3 %	
	(T_{RR})	(N.S)	(T_{RR})	(N.S)	(T_{RR})	(N.S)
4-androstène,11β01,3,17-dione	-----	-----	3.22	30.90	0.82	26.40
4-androstène,11β,17β-diol,3-one	3.77	32.00	2.17	29.60	1.12	27.40
5-androstène,3β01,17-one (déhydroépiandrostérone)	1.43	28.40	0.66	25.65	0.46	24.45
5-androstène,3β,'7β-diol	0.54	24.70	0.49	24.70	0.61	25.40
5α-androst-2-ène,11,17-dione	1.78	29.20	0.46	24.45	0.22	21.85
5α-androst-2-ène,11β01,17-one	2.45	30.25	0.66	25.60	0.30	23.05
3,5-androstadiène,17-one	----	-----	----	-----	----	-----
1,4-androstadiène,11β01,3,17-dione	----	-----	3.85	31.5	0.93	26.85
5α-pregnane	0.18	21.00	0.16	21.00	0.16	21.00
5β-pregnane,3α,17α,20α-triol (pregnantriol)	1.95	29.50	1.40	28.15	1.55	28.50
5β-pregnane,3α,20α-diol (pregnandiol)	0.86	26.40	0.78	26.20	1.00	27.00
5β-pregnane,3α01,20-one (pregnanolone)	1.68	29.00	0.87	26.80	0.66	25.60
5-pregnène,3α01,20-one (pregnenolone)	2.10	29.75	1.09	27.35	0.78	26.25
5α-cholestane	1.00	27.00	1.00	27.00	1.00	27.00
5α-cholestane,3-one	7.11	34.30	3.65	31.35	2.20	29.65
5β-cholestane,3α01	1.84	29.30	1.95	29.20	2.26	29.70
Cholesterol	2.39	30.30	2.56	30.15	2.66	30.25

Tableau I.15 : Screening des stéroides de référence (TMSI) sur trois colonnes OV-225 3%, OV-17 3% et OV-1 3%. T_{RR} = temps de retention relatif (5α-cholestane = 1), N.S = nombre

3.2. Recherches d'une méthode de préparation et de purification de l'extrait urinaire de souris.

Les premières recherches d'une méthode de préparation d'un extrait des stéroides applicable à l'urine de souris ont été entreprises selon les données générales suivantes:

1. Préparation d'un extrait urinaire de souris après une hydrolyse acide à l'HCl. Tentative de détermination colorimétrique par la réaction de Zimmermann des 17-oxo-stéroides totaux présents dans l'extrait brut. Tentative de purification et de séparation des stéroides par la chromatographie sur couche mince de l'extrait.

2. Préparation d'un extrait urinaire après une hydrolyse enzymatique par la β-glucuronidase et une solvolyse des des stéroides conjugués préalablement extraits par l'acétate d'éthyle. Tentative de purification sur colonne de silica-gel et de séparation de deux fractions par la CCM.

3. Préparation d'un extrait urinaire exactement comme sous 2, mais après extraction des stéroides conjugués par une résine synthétique: l'amberlite XAD-2.

La planification de nos travaux et les corrélations entre les trois principales méthodes ainsi décrites se trouvent dans le tableau synoptique (tableau I.16).

3.2.1. Préparation d'un extrait urinaire de souris après hydrolyse acide.

a) Méthode.

Nous avons utilisé des souris mâles de la race R_3, âgés d'environ 1 an.

50 ml d'urine de souris sont hydrolysés, en présence d'HCl conc.sous reflux. Au moment où l'urine entre en ébullition, l'acide est ajouté (10 vol.HCl p.100 vol.urine)(50) ou (30 vol. HCl p.100 vol.urine)(41). L'hydrolyse dure 20 min.dans le premier cas et 10 min. dans le second.

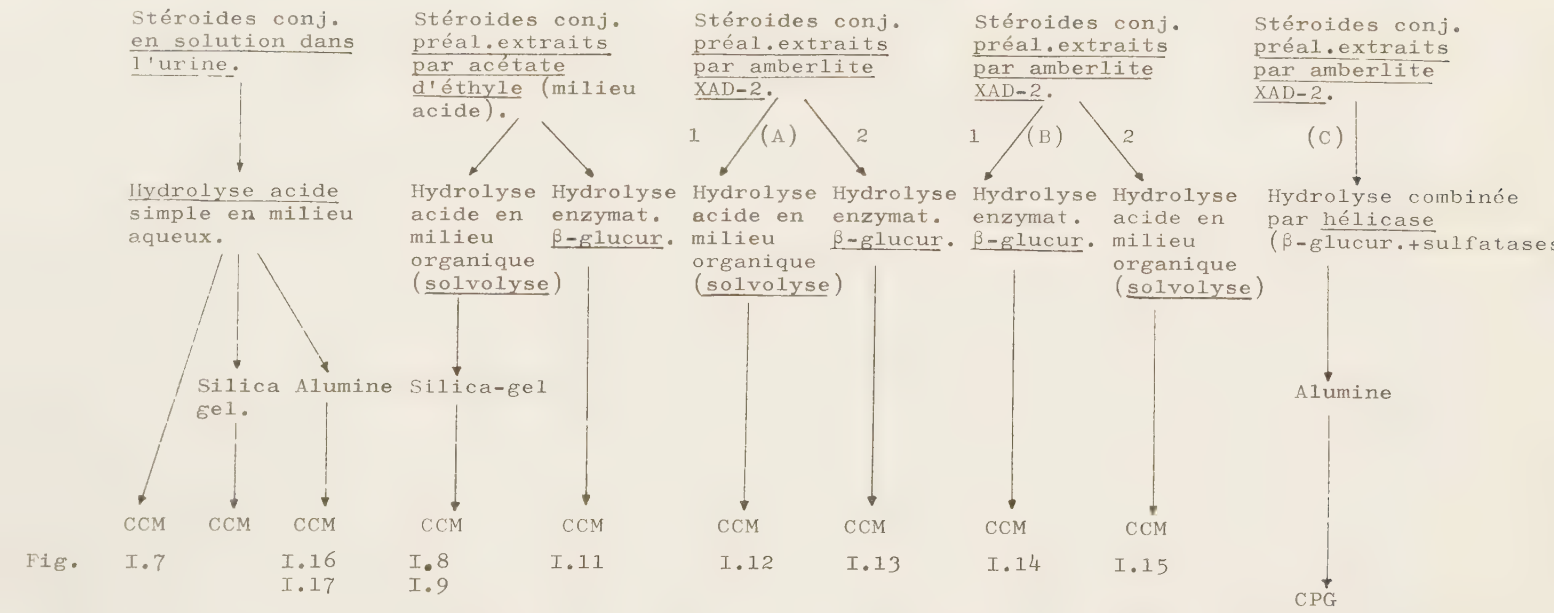


Tableau synoptique I.16 : Résumé des recherches d'une méthode de préparation et de purification de l'extrait urinaire de souris.

Après refroidissement, l'urine est extraite soit une fois avec un mélange de benzène : éther de pétrole (1:1) (5 vol. solvant pour 1 vol. urine), soit deux fois avec du dichloroéthane (1 vol. solvant pour 1 vol. urine). Chaque extraction se fait dans des ampoules à décantation placées sur un agitateur à secousses pendant 20 minutes.

La phase organique est agitée, en présence de 15-20 pastilles de NaOH dans le cas d'une extraction au dichloroéthane et de 20-30 pastilles dans le cas d'une extraction au benzène-éther de pétrole (1:1). Ce lavage dure 10 minutes.

La phase organique est filtrée, déshydratée sur Na_2SO_4 et évaporée à sec (40-45°C). Ces méthodes de préparation dérivent de celle de Peterson (50) d'une part, et de Dreckter (41) d'autre part. Nous avons modifié la première en effectuant l'hydrolyse sous reflux et en remplaçant le lavage par KOH 10% avec une agitation en présence de NaOH en pastilles. La seule modification apportée à la seconde est l'hydrolyse sous reflux, au lieu de plonger l'urine dans l'eau bouillante.

Comportement de l'urine de souris vis-à-vis de la méthode employée

- Hydrolyse acide : L'urine de souris brunit, devient presque noire. On note l'apparition d'un précipité de nature inconnue pour le moment. On sait cependant qu'il est responsable de la présence d'une grande partie des pigments colorés qui se forment au cours de l'hydrolyse acide.

  L'hydrolyse d'une urine humaine, dans les mêmes conditions, ne donne pas lieu à une telle précipitation.

- Extraction : On note la présence d'une forte formation d'émulsion, surtout dans le cas d'une extraction au dichloroéthane. Avec ce solvant, les deux phases ne se séparent pratiquement pas, sinon sous l'effet d'une centrifugation. Par contre, avec le mélange benzène-éther de pétrole (1:1), les deux phases se séparent parfaitement bien. Malheureusement, nous avons été obligés d'abandonner l'emploi de ce mélange pour deux raisons. La première à cause de la toxicité du benzène et la seconde à cause du grand volume nécessaire

pour assurer une extraction quantitative comme la préconise Peterson (50). En effet, nous avons employé pour nos essais 50 ml d'urine et, comme nous le verrons dans la méthode définitive, nous avons doublé cette quantité. Or, l'extraction d'un tel volume par 5 fois le volume urinaire en solvant n'est pas commode. Les impuretés qui résulteraient de l'évaporation d'un tel volume pourraient gêner l'analyse.

Une forte pigmentation passe dans les solvants. La dichloroéthane se charge davantage que le mélange benzène:éther de pétrole. La couleur du premier est pourpre foncé, tandis que le second est jaune.

Dans la phase aqueuse (brun-foncé), on note la formation d'une couche colloïdale de caractère gélatineux qui est due probablement au précipité observé pendant l'hydrolyse acide.

- Lavage avec NaOH en pastilles : On note une faible adsorption de particules noires sur le NaOH. Ce phénomène n'est pas observé dans l'urine humaine.

b) Dosage de l'extrait par la réaction de Zimmermann.

Nous avons tenté de déterminer la teneur en 17-oxostéroïdes du résidu préparé par la méthode décrite plus haut. Ce résidu est sale, gommeux et fortement pigmenté. Nous avons employé la modalité de Peterson pour cette détermination : résidu + 0,2 ml de MDB à 1% + 0,4 ml de KOH aqueux 5 N. Incubation à 25°C pendant 90 minutes. Dilution avec 3,0 ml d'alcool à 50% et extraction du chromogène par 3,0 ml de dichlorométhane. La couleur caractéristique de Zimmermann ne s'est pas développée. Le dichlorométhane avait une couleur inhabituelle d'aspect sale (brun-clair).

Une extraction et une détermination colorimétrique parallèle d'une urine humaine nous a servi de moyen de contrôle de la bonne marche de la réaction.

Conclusion : Une détermination colorimétrique par la réaction classique de Zimmermann d'un extrait urinaire de souris préparé par une hydrolyse acide n'est pas praticable. La grande

quantité de pigments urinaires qui se forment au cours de l'hydrolyse empêche la réalisation de cette réaction sur l'extrait brut.

c) Séparation par la chromatographie sur couche mince (CCM) et mise en évidence, dans l'extrait urinaire, de "substances Zimmermann positives"

L'extrait urinaire est préparé à partir de 50 ml d'urine de souris selon la méthode décrite. Il est repris dans 100 µl d'acétone et appliqué au moyen d'un applicateur linéaire sur une plaque de silica-gel DF/5 (Camag). Si l'extrait ne se dissout pas totalement avec le premier volume d'acétone, on complète sa dissolution une seconde fois avec le même volume qu'on applique sur la plaque.

Un mélange standard (20µg) formés des 7 principaux métabolites de l'urine humaine est déposé parallèlement à l'extrait : androstérone, DHA, étiocholanolone, 11-oxo-androstérone, 11-oxo-étiocholanolone, 11βOH-androstérone et 11βOH-étiocholanolone. La plaque est développée selon la technique décrite précédemment (voir p. 34). La révélation des taches se fait avec les réactifs de Zimmermann en masquant la moitié de l'extrait par une plaque de verre. L'autre moitié est révélée avec l'acide phosphomolybdique à 30% éthanolique.

Résultats : (fig. I.7)

Dans le système de $CHCl_3$-EtOH (98:2), à développements multiples, l'extrait urinaire se sépare d'une manière générale en deux zones :

- Une zone entre la ligne de dépôt et la tache de la DHA. Cette zone présente des traînées jaunâtres visibles. Dans l'ensemble, nous pouvons la considérer comme zone plus ou moins propre (Zone I). Les $C_{19}O_3$ migrent dans cette zone.

- Une zone qui se situe entre la tache de la DHA et le front du solvant. Cette zone contient la majorité des pigments qui se séparent en plusieurs bandes colorées (jaune, gris-brun, rose, etc...) (Zone II). Les $C_{19}O_2$ migrent dans cette zone.

Après la révélation de la plaque par les réactifs de Zimmermann, nous notons que :

a) Il est impossible de détecter la présence de "substances Zimmermann positives" dans la zone II, ceci à cause de la présence des pigments. Cependant, lorsque l'on utilise pour la CCM un extrait urinaire obtenu par l'emploi du benzène-éther de pétrole (1:1), on distingue sur la plaque et dans la zone II une bande en pourpre clair, entourée de pigments, qui migre plus haut que l'androstérone.

b) La zone I montre la présence de bandes qui se colorent en pourpre et qui migrent dans la région de $C_{19}O_3$. Certaines migrent au niveau des stéroïdes de référence et d'autres pas (voir fig. I.7). L'intensité de la coloration varie d'une bande à une autre.

Après la révélation avec l'acide phosphomolybdique, nous notons que :

a) les mêmes substances révélées par les réactifs de Zimmermann apparaissent avec ce réactif;

b) d'autres substances sont également révélées par le réactif, notamment dans la zone II.

Conclusion : La chromatographie sur couche mince d'un extrait urinaire de souris, préparé par une hydrolyse acide, ne permet pas une purification adéquate. Les pigments qui contaminent l'extrait se séparent en plusieurs bandes colorées et migrent surtout dans la région de $C_{19}O_2$ (zone II). Donc, il y a une forte chance pour que ces pigments masquent ou interfèrent avec les $C_{19}O_2$ propres à l'extrait urinaire, si jamais ils y sont présents.

La zone I montre apparemment la présence de substances Zimmermann positives qui pourraient être des 17-oxo-stéroïdes ou d'une autre nature. Wilson, en 1958, a relaté la présence, dans l'urine de souris femelles cancéreuses, des stéroïdes $C_{19}O_3$ non identifiés, du 11βOH-4-androstène, 3-17-dione et de sa forme saturée le 11β-OH-androstane,3,17-dione. Il a constaté

une absence totale de l'androstérone, de l'étiocholanolone et de la DHA. Par contre, il trouve deux métabolites qui migrent de part et d'autre de la DHA dans une séparation de chromatographie sur papier (22).

La révélation avec l'acide phosphomolybdique nous montre que l'extrait urinaire contient des "substances stéroïdiques" de nature non cétoniques ou probablement des substances d'une autre nature. En effet, l'acide phosphomolybdique n'est pas spécifique des 17-oxo-stéroïdes mais révèle également d'autres substances de nature stéroïdiques ou lipidiques (136).

d) Tentative de purification de l'extrait urinaire par la chromatographie sur colonnes.

Ayant constaté l'impossibilité d'une purification suffisante de l'extrait par la CCM, nous avons essayé de le purifier par la chromatographie sur colonnes.

Deux types d'adsorbants sont employés : le silica-gel et l'alumine neutre de Merck. Les colonnes sont préparées dans le dichlorométhane et l'élution se fait avec des concentrations croissantes du méthanol dans le dichlorométhane.

L'extrait est séparé en plusieurs fractions. Chaque fraction est alors à son tour séparée par CCM ($CHCl_3$: EtOH 98:2) ce qui permet d'étudier simultanément le comportement des pigments et des substances Zimmermann.

1) Colonne de silica gel (Merck)

Préparation de l'extrait : 50 ml d'urine sont hydrolysés par HCl (30%, 10 minutes, sous reflux). Après extraction au dichloroéthane et lavage avec NaOH en pastilles, il est repris avec 5 ml de dichlorométhane. Une surcharge de $C_{19}O_2$ + $C_{19}O_3$ est ajoutée à l'extrait pour permettre de déterminer l'ordre d'élution de la colonne.-

Chromatographie : La colonne (1 cm. de diamètre int.) est préparée par pulvérisation du silica-gel en pluie fine (9) dans le dichlorométhane (2g). La granulométrie de silica-gel est de 70-230 mesh.

La colonne est lavée avec 2 x 25 ml de DCM. Lorsque le niveau arrive à 1 cm. de la surface de l'adsorbant, l'extrait est introduit dans la colonne au moyen d'une pipette Pasteur. On rince avec 2 x 5 ml de DCM. Ces deux fractions sont écartées. L'élution est faite comme suit :

- Fraction I : 60 ml de dichlorométhane
- Fraction II : 35 ml de DCM contenant 0,5 % méthanol
- Fraction III : 20 ml " " " 2,0 % "
- Fraction IV : 20 ml " " " 10,0 % "
- Fraction V : 10 ml de méthanol.

Résultats :

Le nombre de ml de DCM de la fraction I a été déterminé en fonction de la sortie d'un pigment pourpre. En effet, une majeure partie de ce pigment quitte la colonne avec un simple lavage au DCM. Ce pigment migre sur la plaque de CCM entre la DHA et le front du solvant.

A noter qu'aucune trace n'a été détectée dans la fraction I, à l'exception de pigment mentionné.

Dans les fractions F II, F III et F IV, les 17-oxo-stéroïdes ajoutés à l'extrait sont élués. Malheureusement, ces fractions restent contaminées par des impuretés et d'autres pigments qui migrent également dans la région de $C_{19}O_2$. On note aussi des traînées jaunâtres qui apparaissent entre les stéroïdes révélés dans la région de $C_{19}O_3$.

La fraction V ne contient pas de trace visible, ce qui prouve que l'élution de la colonne est complète avec 10% de méthanol dans le DCM.

Conclusion:

Ce système de chromatographie sur silica-gel (DMC-Méthanol) permet dans une certaine mesure de débarasser l'extrait urinaire de souris d'une bonne partie de ses pigments. Cependant, les fractions qui sont supposées contenir les 17-oxo-stéroïdes restent fortement contaminées et nécessitent

une nouvelle purification par un autre procédé. La chromatographie sur silica-gel, telle qu'utilisée ici, contribue à la purification mais pas de manière suffisante pour nos besoins.

2) Colonne d'alumine (Merck)

Préparation de l'extrait : 2 lots de 50 ml d'urine de souris sont extraits selon la méthode décrite (voir colonne de silica-gel). Un lot est surchargé d'un mélange de ($C_{19}O_2$ + $C_{19}O_3$). Le second reste sans surcharge.

Préparation de la colonne : L'alumine (6g) remplace le silica-gel. L'activité de l'alumine est de 1.

Chromatographie : La colonne est lavée avec 2 x 25 ml de dichlorométhane. Après introduction de l'extrait (5 ml), on lave avec 2 x 5 ml DCM. L'élution se fait comme suit :

- Fraction I : 25 ml de DCM
- Fraction II : 25 ml de DCM contenant 0,5 % méthanol
- Fraction III : 50 ml " " " 2,0 % "
- Fraction IV : 25 ml " " " 5,0 % "
- Fraction V : 25 ml " " " 10,0 % "

Résultats : (fig.I.16 et I.17)

La première observation importante à faire est la "non élution" des pigments pourpres de la fraction I de la colonne de silica-gel.

Dans cette fraction, on note la sortie d'une faible quantité de pigments bruns qui migrent sur la plaque de CCM avec le front du solvant.

Les stéroïdes ajoutés à l'extrait urinaire sont élués avec les fractions F II et F III (0,5 - 2,0% méthanol). Or, la plus forte pigmentation est éluée en même temps que ces deux fractions (surtout la fraction F III).

Les fractions F IV et F V, bien qu'elles ne contiennent pas de 17-oxo-stéroïdes, sont également contaminées par des pigments.

Signalons dans l'urine de souris sans surcharge de stéroïdes standard la présence de substances détectables à l'acide sulfurique 50% méthanolique, qui sont éluées dans les fractions F II (0,5% méthanol), F IV et F V (5 et 10% méthanol). Ces substances migrent sur la plaque de CCM dans la région de $C_{19}O_3$. Elles sont apparemment de nature polaire.

Conclusion :

La chromatographie sur colonne d'alumine, dans un système de dichlorométhane-méthanol, d'un extrait urinaire de souris, ne contribue pas du tout à sa purification. Les fractions qui sont supposées contenir les 17-oxo-stéroïdes (éventuels) restent fortement contaminées par des pigments urinaires.

3.2.2. Préparation d'un extrait urinaire de souris, après solvolyse et hydrolyse enzymatique par la β-Glucuronidase des stéroïdes conjugués, préalablement extraits par l'acétate d'éthyle (132).

Principe :

Les stéroïdes conjugués sont extraits de l'urine à pH acide, en présence de NaCl, par l'acétate d'éthyle (32).

Après hydrolyse de la forme sulfatée par solvolyse (30) la forme gluco-conjuguée est hydrolysée par la β-Glucuronidase de mollusque pendant 48 h. (9)

Des deux fractions ainsi préparées, la première contient les stéroïdes prélablement conjugués à l'acide sulfurique (F solv.) et la seconde contient les stéroïdes préalablement conjugués à l'acide glucuronique (F gluc.)

a) Méthode :

Extraction des conjugués : L'urine (100 ml) est acidifiée avec l'acide sulfurique à 50% jusqu'à pH :1,0. Du NaCl (20g/ 100 ml d'urine) est ajouté. Après dissolution totale du sel, l'urine est extraite avec l'acétate d'éthyle (3 x vol. urinaire). Chaque extraction dure 15 minutes (agitateur à secousses).

Les trois volumes d'acétate d'éthyle sont réunis. Ils contiennent les stéroïdes sulfo-et gluco-conjugués.

Solvolyse : L'acétate d'éthyle est incubé à 37°C pendant 18 h. afin d'hydrolyser la forme sulfatée. A la fin de la solvolyse, le volume est réduit à 50 ml. (78) et la phase organique est lavée avec 1/10 vol. de NaOH 1 N jusqu'à décoloration totale du NaOH. Ce lavage est suivi avec un lavage à l'eau (1/10 vol.) jusqu'à disparition de l'alcalinité.

Les phases aqueuses sont gardées. La phase organique est déshydratée sur Na_2SO_4 et évaporée à sec (40 - 45°C).

L'extrait sec est repris dans une aliquote d'éthanol et gardé au froid : F solv.

Hydrolyse enzymatique : Les phases aqueuses (NaOH et eau) contenant les gluco-conjugués et d'autres impuretés sont réunies. L'acétate d'éthyle en trace est évaporé. Le pH est ramené à 4 - 4,2 avec l'acide acétique cristallisable. On y ajoute 1/10 vol. du tampon acétate (2M) 500 U.I de β-Glucuronidase /ml d'urine et 3 gouttes de chloroforme. La solution est incubée pendant 24 h. à 37°C. Un nouveau lot de l'enzyme est ajouté (500 U.I) et l'incubation est continuée pendant 24h. (9).

A la fin de l'hydrolyse, les stéroïdes libres sont extraits avec l'acétate d'éthyle (3 x vol.). Ce dernier est lavé avec NaOH 1 N et l'eau.

Après deshydratation sur Na_2SO_4, le solvant est évaporé à sec (40-45°C). L'extrait est repris dans une aliquote d'éthanol (F. gluc.)

Purification de la fraction solvolyse par colonne de silica-gel : La F solv. de l'urine de souris préparée par cette méthode est très pigmentée, (couleur pourprefoncé). Son aspect rappelle celui de l'extrait préparé après une hydrolyse acide.

Cette fraction est purifiée partiellement par une colonne de silica-gel (voir méthode P55).

La colonne est lavée avec du dichlorométhane jusqu'à la sortie totale des pigments pourpres, puis les stéroïdes sont élués en deux fractions au lieu de trois, la première avec 50 ml de DCM contenant 2% de méthanol et la seconde avec le même volume de DCM contenant 5% de méthanol (F solv. 2%) et (F. solv. 5%).

Séparation par chromatographie sur couche mince : Toutes les fractions sont séparées sur CCM dans un système de chloroforme:éthanol 98:2.

La plaque est révélée avec les réactifs de Zimmermann.

b) Résultats :

I. Comportement de l'urine vis-à-vis de la méthode employée.
Pendant l'extraction des conjugués

L'extraction des stéroïdes conjugués par cette méthode fournit un extrait pigmenté. Le changement de la couleur s'accentue avec le temps. Comme c'est le même solvant qui est incubé pour effectuer la solvolyse, il devient à la fin de l'incubation pourpre foncé rappelant la couleur du vin.

Pendant l'extraction, une forte émulsion se produit et il est indispensable de centrifuger pour séparer les deux phases. D'autre part, on note l'apparition d'une masse gélatineuse qui s'agglomère entre les deux phases. Elle est due certainement au précipité qui se forme quelques minutes après l'acidification de l'urine et l'addition de NaCl.

Pendant la solvolyse

La fraction de la solvolyse reste pigmentée, ceci malgré le lavage au NaOH et à l'eau. Elle ne peut pas être chromatographiée sur couche mince et nécessite une purification sur colonne de silica-gel.

La Fraction solvolyse à 2% méthanol est rose-mauve. Donc elle contient une bonne quantité de pigments qui sont élué de la colonne en même temps.

La Fraction solvolyse à 5% méthanol est de couleur brun-clair. Elle est également contaminée.

Pendant l'hydrolyse enzymatique

La fraction obtenue est propre par rapport à celle de la solvolyse. Elle est jaune-clair et ne contient pas de pigments pourpres.

II. Séparation sur couche mince des fractions F. solv. à 2%, F. solv. à 5% et F. gluc.

Fraction solvolyse à 2% méthanol (fig. I.8)

La chromatographie de cette fraction présente une zone pigmentée (brun-clair) qui migre du point de départ jusqu'au niveau du 11β-OH-étiocholanolone. Le reste de la plaque est relativement propre à l'exception d'un pigment bleu qui migre avec le front du solvant. Un second pigment rose vient s'intercaler entre le 11-oxo-étiocholanolone et le 11β-OH-androstérone.

La révélation de cette fraction par les réactifs de Zimmermann nous montre la présence :

- d'une bande Zimmermann positive au-dessus de l'androstérone
- d'une bande Zimmermann positive légèrement inférieure au 11β-OH-étiocholanolone
- d'une bande Zimmermann positive au niveau de l'étiocholanolone.

Fraction solvolyse à 5% méthanol (fig. I.9)

Aucune trace n'est visible dans cette fraction, ni à la lumière visible, ni à l'U.V.

Fraction glucuronique (fig. I.10 et I.11)

Cette fraction présente la même zone pigmentée en brun, ainsi que le même pigment rose entre le 11-oxo-étiocholanolone et le 11β-OH-androstérone mentionnés dans la F. solv. à 2%. Des pigments bruns en quantité importante restent au point du départ sans migration.

La révélation de la plaque nous montre la présence :

- d'une bande Zimmermann positive assez importante qui se trouve juste au-dessus de l'androstérone (sa présence a été déjà signalée dans F solv. à 2% méthanol et dans un extrait chromatographié sur CCM après hydrolyse acide
- d'une bande Zimmermann positive au niveau de l'étiocholanolone (mentionnée dans F. solv. à 2%);
- d'une bande Zimmermann positive entre l'étiocholanolone et le 11-oxo-androstérone;
- de plusieurs bandes Zimmermann positives dans la région de $C_{19}O_3$ dont certaines sont au niveau des références appliquées sur la plaque et d'autres pas.

La fraction glucuronique donne une image en CCM qui ressemble beaucoup à celle obtenue avec un extrait chromatographié après hydrolyse acide, ce qui n'est pas le cas de la fraction de solvolyse où les bandes de Zimmermann positives sont peu nombreuses.

Conclusion:

C'est une méthode longue qui permet de séparer l'extrait urinaire en deux fractions: la fraction de solvolyse très pigmentée qui nécessite une purification préalable sur colonne de silica-gel et la fraction glucuronique qui peut être séparée sur CCM sans purification préalable sur colonne.

La séparation sur CCM et la révélation de ces fractions par les réactifs de Zimmermann montre la présence d'une zone pigmentée entre le point du départ et le 11-oxo-étiocholanolone. Le reste de la plaque peut être considéré comme zone propre.

Les deux fractions montrent la présence de bandes Zimmermann positives qui sont prédominantes dans la fraction glucuronique.

3.2.3. Préparation d'un extrait urinaire de souris, après solvolyse et hydrolyse enzymatique par la β-glucuronidase des stéroides conjugués, préalablement extraits par une résine synthétique: l'amberlite XAD-2.

Principe :

L'amberlite XAD-2 est une résine synthétique de polystyrène sans charges ioniques qui a la propriété de retenir toute substance organique hydrosoluble.

Bradlow (71) l'a introduite en 1968 dans l'extraction des stéroides conjugués de l'urine. Depuis, plusieurs chercheurs l'emploient en hormonologie (127-130)(121).

Les stéroides conjugués sont adsorbés sur une colonne d'amberlite XAD-2. Ils sont par la suite élués avec du méthanol. Ce dernier est évaporé à sec et l'extrait est hydrolysé par solvolyse, ensuite par la β-glucuronidase. Une fraction provenant de la solvolyse et une fraction provenant de l'hydrolyse enzymatique sont préparées séparement.

a)Méthode :

Dans une colonne de 15 mm de diamètre (25 g de XAD-2), on fait passer 100 ml d'urine de souris goutte-à-goutte. La colonne est lavée à l'eau (100 ml) et les stéroides conjugués sont élués avec du méthanol (100 ml).

Le méthanol est évaporé à sec sous vide (40-45 °C). L'extrait est repris dans 25 ml de H_2O. Le pH est ramené à 1,0 avec l'acide sulfurique 50 %. Après addition de NaCl (20 g pour 100 ml), on extrait avec l'acétate d'éthyle (3 x vol.) pendant 15 min. à chaque fois. Les volumes d'acétate d'éthyle sont réunis, incubés à 37 °C pendant 18 h (solvolyse).

La préparation de la fraction de solvolyse et celle de l'hydrolyse enzymatique suit exactement les étapes de la méthode décrite à la page 59.

Remarques:

1. Dans la méthode présente, la fraction de la solvolyse ne subi pas une purification par une colonne de silica-gel.
2. Dans une seconde série d'essais, nous avons effectué d'abord l'hydrolyse enzymatique et par la suite la solvolyse.
3. Dans des essais préliminaires, nous avons déterminé le volume d'élution des stéroides conjugués de la colonne d'amberlite, par passage de 100 ml d'eau surchargée par des stéroides de référence dans la colonne. L'élution a été faite par fractions de 25 ml de méthanol. Chaque fraction a été séparée par couche mince dans le système chloroforme:éthanol 98:2 à développements multiples déjà décrit.

b) Résultats :

I. Comportement de l'urine de souris vis-à-vis de la méthode employée.

Pendant l'extraction des conjugués par l'amberlite.

L'élution des stéroides conjugués par le méthanol donne un extrait de couleur jaune. Aucune trace de pigments pourpres, semblables à ceux obtenus par la méthode d'extraction à l'acétate d'éthyle (pH 1 ; NaCl) n'apparait. Après évaporation du solvant, le résidu est d'aspect jaune, il est hydrosoluble et a une continance gommeuse.

Pendant l'hydrolyse.

1) Cas où la solvolyse est faite en premier lieu, puis l'hydrolyse enzymatique.

fraction de solvolyse : Après 18 h d'incubation à 37 °C, cette fraction ne change pas de couleur. Elle reste jaune limpide et ne nécessite pas une purification sur colonne de silica-gel pour débarasser les pigments pourpes.

fraction glucuronique : L'acétate d'éthyle est pratiquement incolore. Dans certains essais, nous avons noté la présence d'une coloration légèrement jaune.

2) Cas où l'hydrolyse enzymatique est faite en premier lieu, puis la solvolyse.

La situation est inversée. La fraction glucuronique se colore d'avantage, mais reste de loin moins colorée que la fraction solvolyse du cas 1.

La fraction solvolyse qui est préparée en dernier lieu est incolore.

éparation sur couche mince des fractions solvolyse et glu-
uronique.

1) Cas où la solvolyse est faite en premier lieu, puis l'hydrolyse enzymatique.

fraction de solvolyse (fig.I.12)

La chromatographie de cette fraction démontre la présence:

- d'une zone pigmentée en brun qui migre entre le départ et le 11-oxo-androstérone.
- d'un pigment bleu qui migre entre l'androstérone et le front du solvant.
- d'une forte pigmentation brune qui reste au point du départ sans migration.

La révélation de cette fraction nous montre la présence:

- d'une bande fortement colorée en pourpre (Zimmermann positive) qui se situe au-dessus de l'androstérone.
- d'une bande légèrement colorée en pourpre avec le front du solvant. Elle est due au blanc (eau au lieu d'urine.).

fraction glucuronique (fig.I.13).

Cette fraction est plus propre que la fraction de solvolyse. Dans l'ensemble, la plaque de CCM est propre. On ne note pas l'apparition d'une zone pigmentée en brun comme c'était le cas avec la première fraction.

Après révélation de cette fraction par les réactifs de Zimmermann, on note la présence:

- d'une bande Zimmermann positive qui se situe au-dessus de l'androstérone (mentionnée dans la fraction solvolyse).
- trois bandes Zimmermann positives qui migrent avec le front du solvant (dues à la manipulation).
- de plusieurs bandes Zimmermann positives dans la région de $C_{19}O_3$ dont certaines correspondent aux stéroides de référence et d'autres pas.

2). Cas où l'hydrolyse enzymatique est faite en premier lieu, puis la solvolyse.

fraction de solvolyse.(fig.I.14)

La chromatographie de cette fraction démontre la présence:

- d'une bande fortement colorée en pourpre (Zimmermann positive)dans la région de $C_{19}O_2$. Il s'agit de la même bande retrouvée dans la même fraction décrite sous 1.

Dans cette fraction, on note par contre une absence de la zone pigmentée en brun et du pigment bleu mentionnées sous 1.

fraction glucuronqiue (fig.I.15)

Dans cette fraction, les zones des $C_{19}O_2$ et $C_{19}O_3$ sont propres. La révélation de la plaque montre la présence de plusieurs bandes Zimmermann positives comme cela a été décrit dans la même fraction du cas 1.

nclusion :

La méthode présente offre l'avantage sur la méthode déc-
e sous 3.2.2 dans le sens où elle permet la préparation des
raits urinaires provenant soit de la fraction sulfatée (F.solv),
it de la fraction glucuronique (F.glu) plus propres.

Les pigments pourpres sont absents dans la fraction de la
volyse,et de ce fait une purification supplémentaire de cette
action par la colonne de silica-gel n'est pas nécessaire comme
était le cas dans la méthode d'extraction des conjugués par
acétate d'éthyle.

Cependant, on note que malgré l'absence de ces pigments,
fraction de solvolyse contient d'autres pigments de couleur
un-jaune et de nature polaire qui migrent en CCM entre le point
départ et environ la moitié de la plaque.

Nous avons remarqué que le degré de pureté des fractions
éparées par cette méthode,dépend de l'ordre dans lequel la frac-
on glucuronique ou sulfatée est préparée. Si la solvolyse est
ite en premier lieu, la fraction de solvolyse obtenue est plus
ntamminée que dans le cas où la même fraction est préparée après
oir fait l'hydrolyse enzymatique de l'urine, séparé la fraction
s glucuronides et solvolysé la phase contenant les sulfo-conjugués.

Il est à noter que cette remarque est aussi valable pour la
action des glucuronides.

Un autre avantage que cette méthode offre est l'utilisa-
on de la colonne d'amberlite pour l'extraction des gluco et des
lfo-conjugués.

Cet avantage sera discuté plus tard.

4°. Conclusion du chapitre I :

En examinant les résultats obtenus dans ces essais préliminaires, et sans tenir compte du comportement de l'urine de souris à l'égard des différentes méthodes employées, la conclusion la plus importante que nous pouvons en tirer est la présence dans l'extrait urinaire de cet animal de substances séparées par la CCM qui se colorent avec les réactifs de Zimmermann.

La majorité de ces substances, de nature inconnue pour le moment, migrent sur CCM dans une zone où se trouvent habituellement les $C_{19}O_3$ de l'urine humaine (11-oxo-androstérone, 11-oxo-étiocholanolone, 11βOH-androstérone et 11βOH-étiocholanolone).

On note également la présence de quelques bandes qui se colorent avec les mêmes réactifs et qui migrent dans la zone de $C_{19}O_2$ (androstérone, DHA et étiocholanolone). La bande la plus fortement colorée se situe juste au-dessus de l'androstérone, mais aucune trace n'a été détectée de substances qui pourraient correspondre aux $C_{19}O_2$ mentionnées ci-dessus.

La séparation de l'extrait urinaire en deux fractions glucuronique et sulfatée et l'analyse de ces dernières par la CCM, nous montre que la plupart des substances détectées sont apparemment des gluco-conjuguées puisqu'on les trouve surtout dans la fraction glucuronique.

La comparaison des trois méthodes de préparation de l'extrait nous a conduit à écarter la méthode qui emploie l'hydrolyse acide à cause de la formation exagérée des pigments lors de cette opération, et ceci sans tenir compte de ses effets destructifs sur la structure moléculaire des stéroides. A ce propos, une situation semblable avait été signalée par Charollais dans l'urine de cobaye (131).

Nous avons également écarté la méthode de l'hydrolyse enzymatique et de solvolyse des stéroides conjugués, préalablement extraits par l'acétate d'éthyle à pH 1,0 pour la même raison.

En effet, les pigments qui se forment au cours de l'extraction des conjugués gênent considérablement la suite de l'analyse.

En conclusion et compte tenu de ces observations, il nous a paru que la méthode d'extraction des conjugués par la colonne d'amberlite XAD-2 présente un avantage sérieux sur les autres méthodes.

L'extrait contenant ces stéroides et qui a été préparé après passage de l'urine dans la colonne reste plus ou moins contaminé, mais dépourvu des pigments pourpres formés dans les autres méthodes.

En se basant sur les avantages de la chromatographie en phase gazeuse, connus et constatés lors de notre choix de méthodes physico-chimiques (p 41) , nous avons jugé préférable de compléter l'analyse de l'extrait provenant de l'amberlite, par l'emploi de cette technique dont la spécificité, la sensibilité et le pouvoir de séparation sont nettement supérieurs aux autres méthodes (par exemple: la CCM).

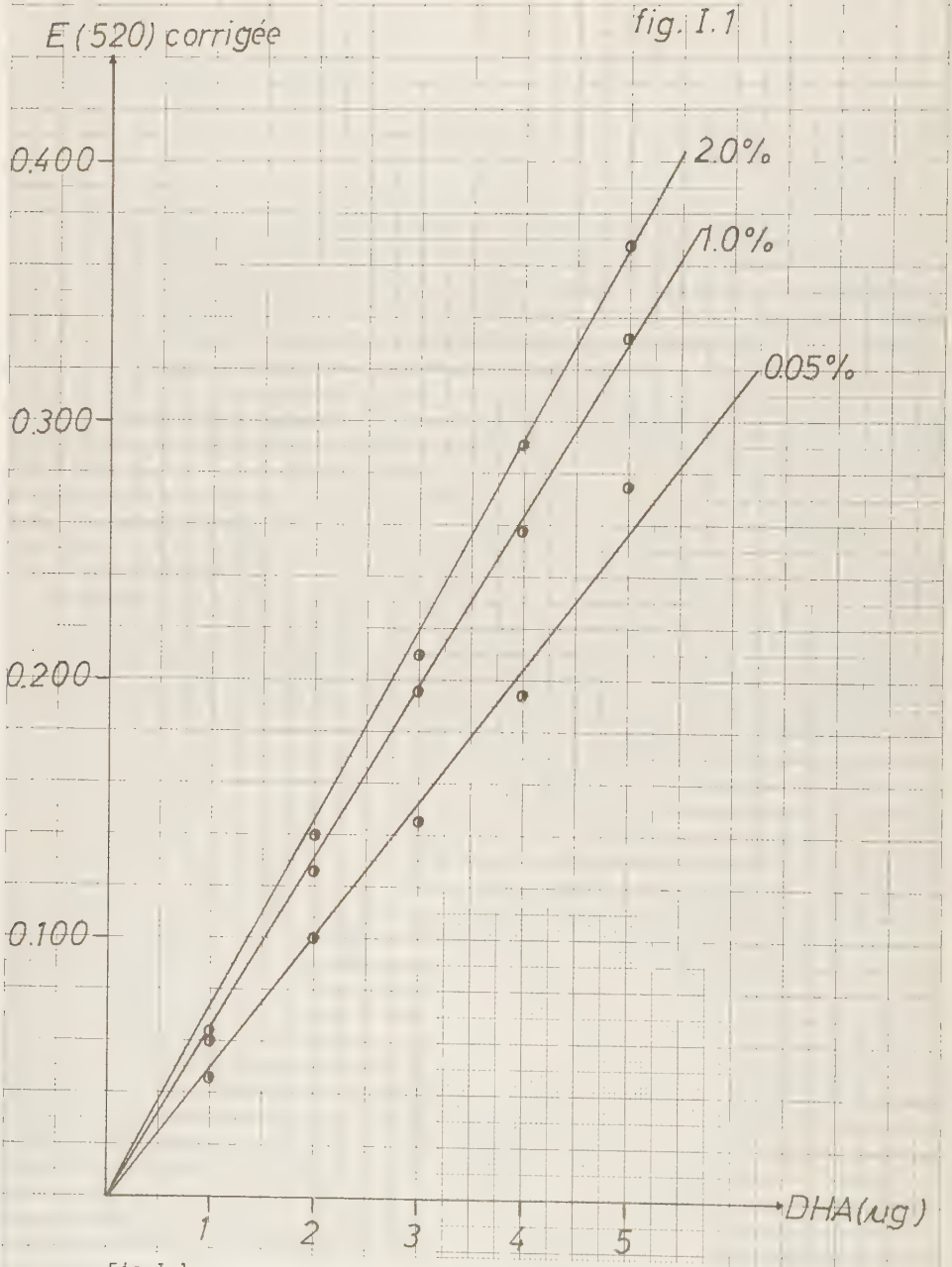


Fig.I.1

Variation de l'extinction de la DHA en fonction de différentes concentrations de MDB éthanolique.
"0,05 ml stand.+0,10 ml MDB à n% + 0,05 ml BTMH à 40% aq."
Dilution finale avec 1,0 ml d'éthanol absolu.

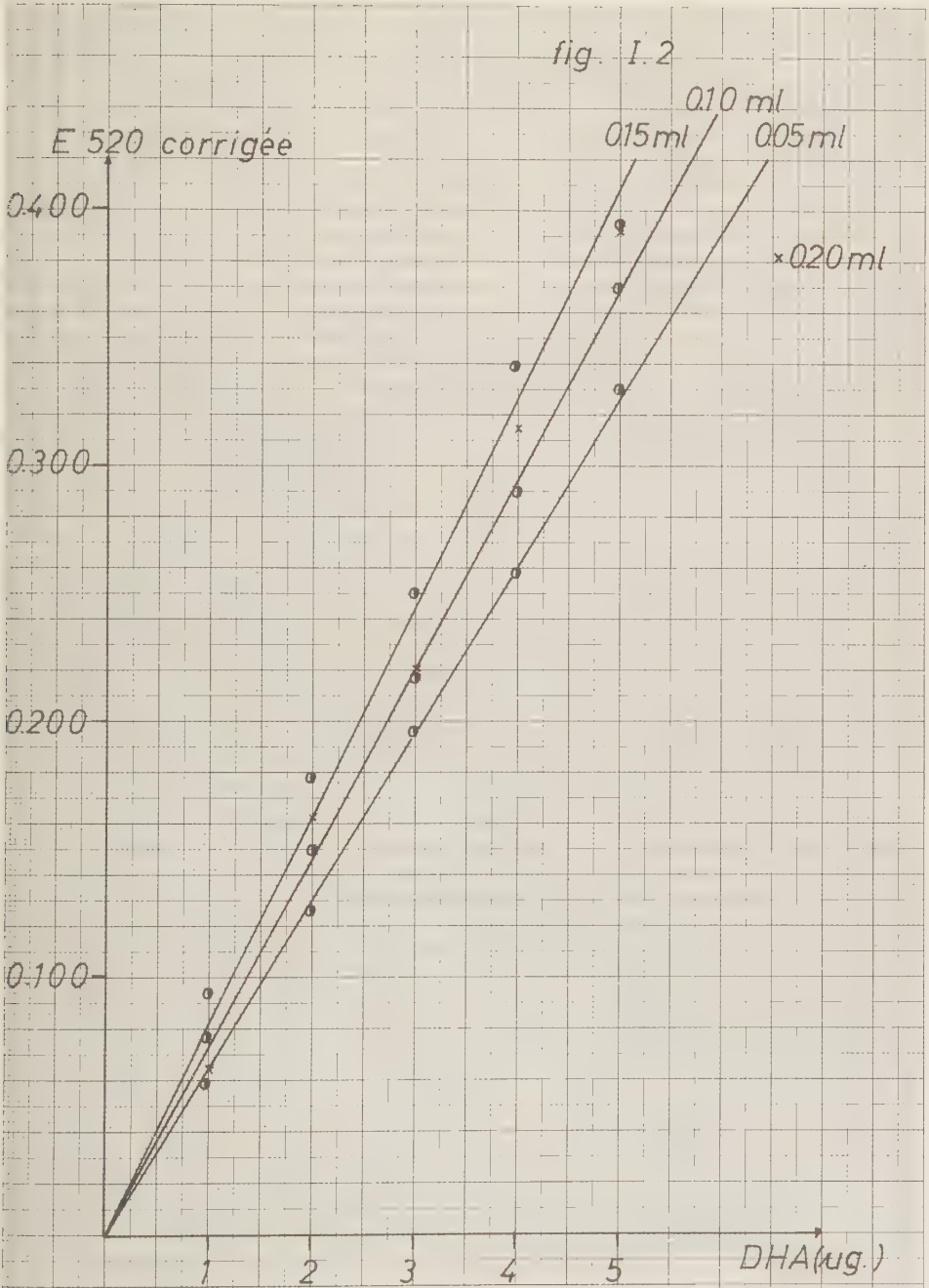


Fig.I.2
Variation de l'extinction de la DHA en fonction de différents volumes de BTMH à 40% aq.
"0,05 ml stand.+0,10 ml MDB à 1% éthanolique + n ml de BTMH à 40% aq."
Dilution finale avec 1,20 ml d'éthanol absolu

fig. I.3

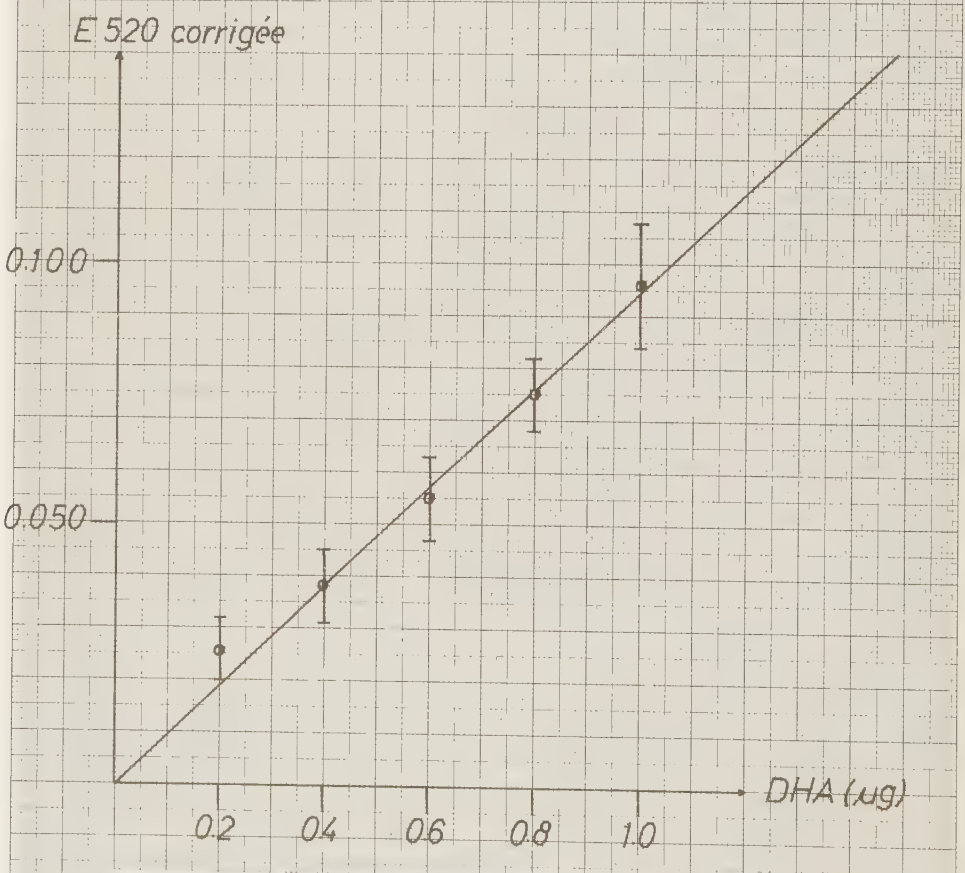


Fig. I.3

Variation de l'extinction de la DHA en fonction de la quantité de DHA .
"0,10 ml stand.+ 0,10 ml MDB à 1% éthanolique+0,10 ml BTMH à 40% aq."
Dilution finale avec 0,5 ml d'éthanol absolu .

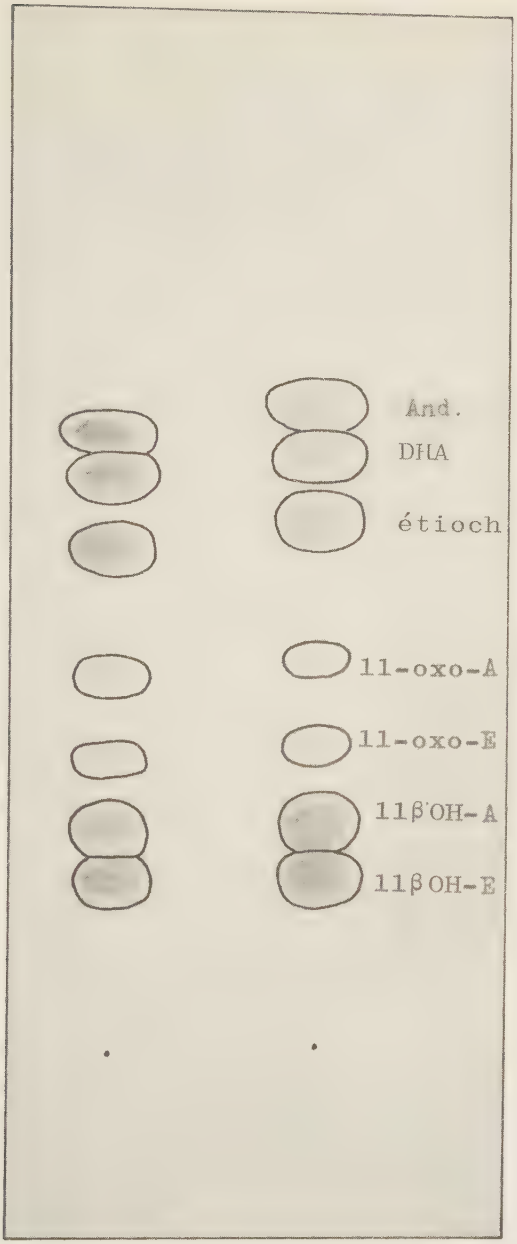


Figure I. 4

Séparation sur CCM(silica-gel DF/5,Camag d'un mélange de stéroïdes standards dans un système de cuve saturée (chloroforme:éthanol 98:2) à développements multiples .

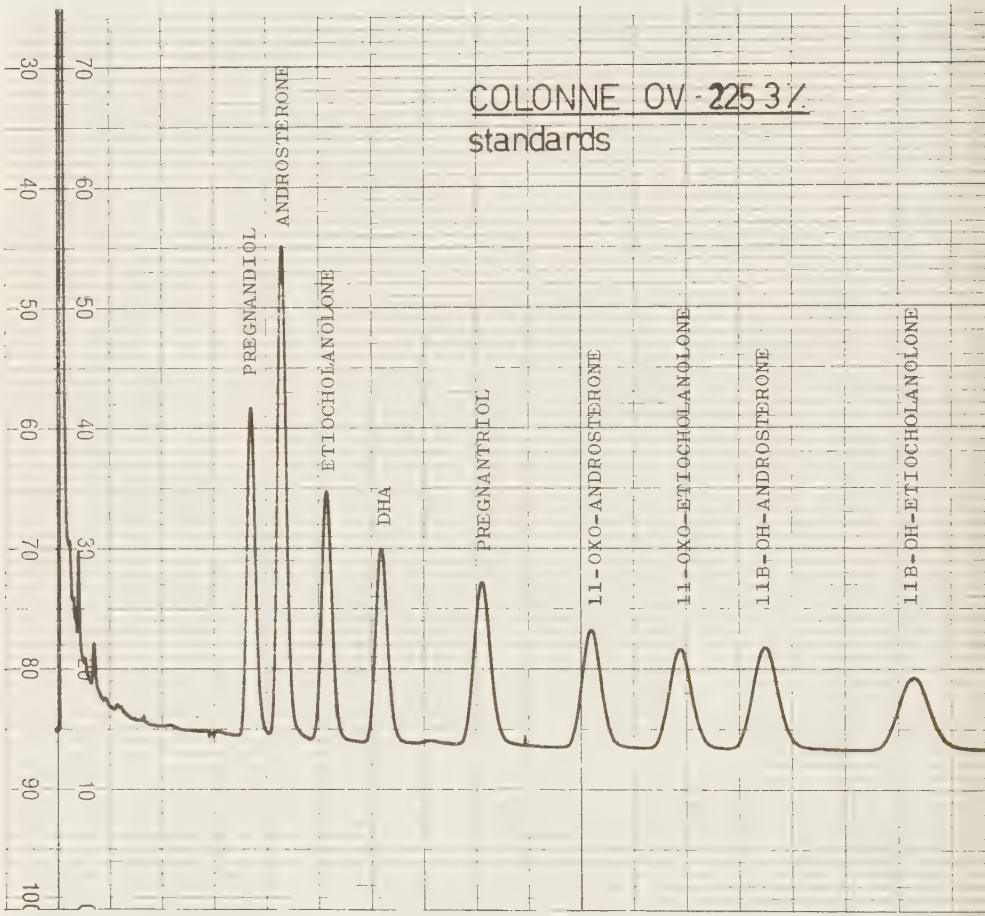


Fig.I.5

Séparation d'un mélange de stéroïdes $C_{19}O_2$, $C_{19}O_3$, du pregnanediol et du pregnanetriol de référence sur une colonne OV-225 à 3%. "T° de la colonne 225, gaz porteur:1,0 kg/cm^2, H_2/air:1,0/1,3 , atténuation:10 x 16, dérivés TMSi".

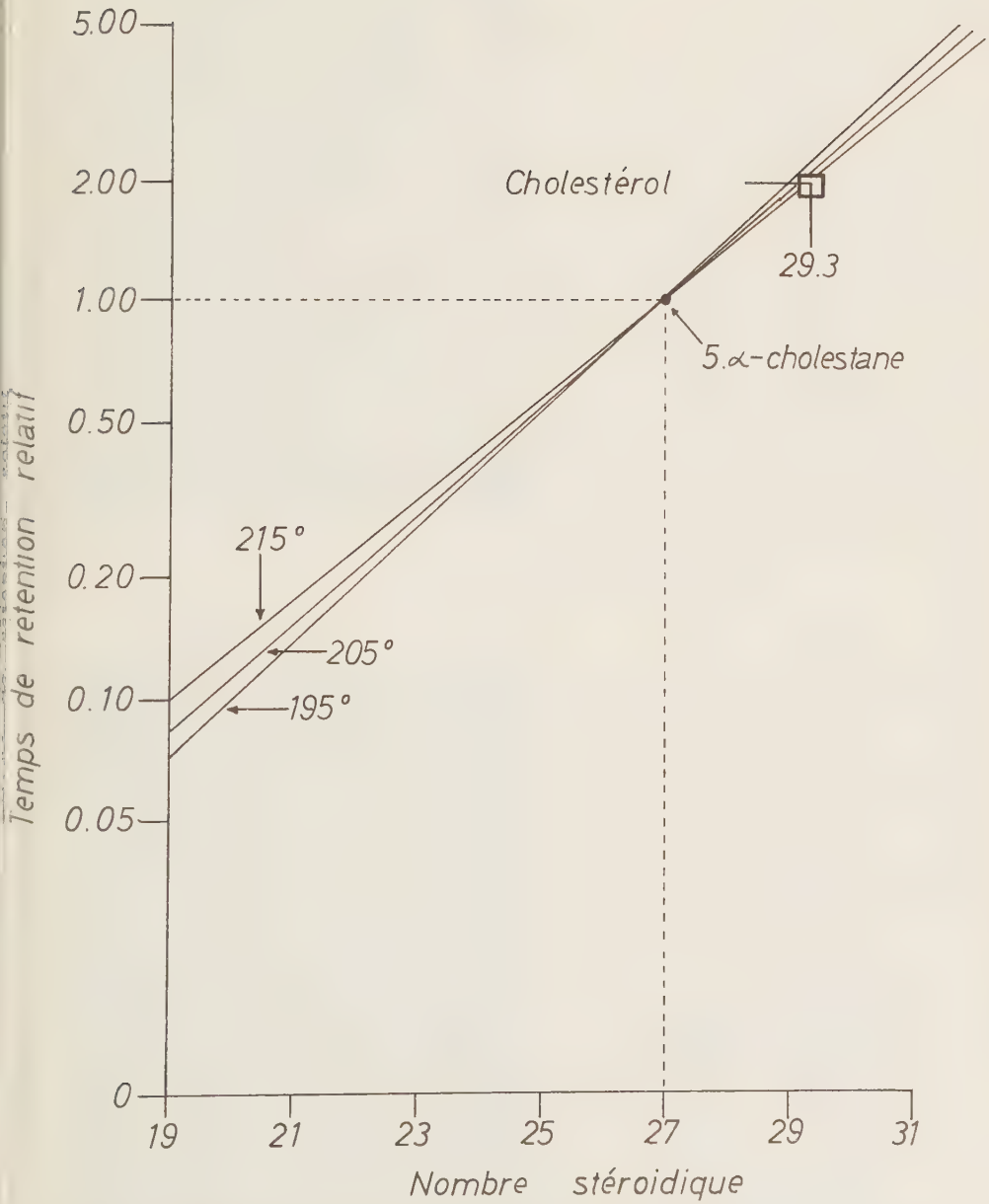


Fig.I.6
Détermination du nombre stéroïdique de Vandenheuvel.
Le temps de rétention relatif est calculé par rapport au 5 α-cholestane et porté sur une échelle log. .
Le nombre de C est porté sur une échelle cartésienne.
(123)

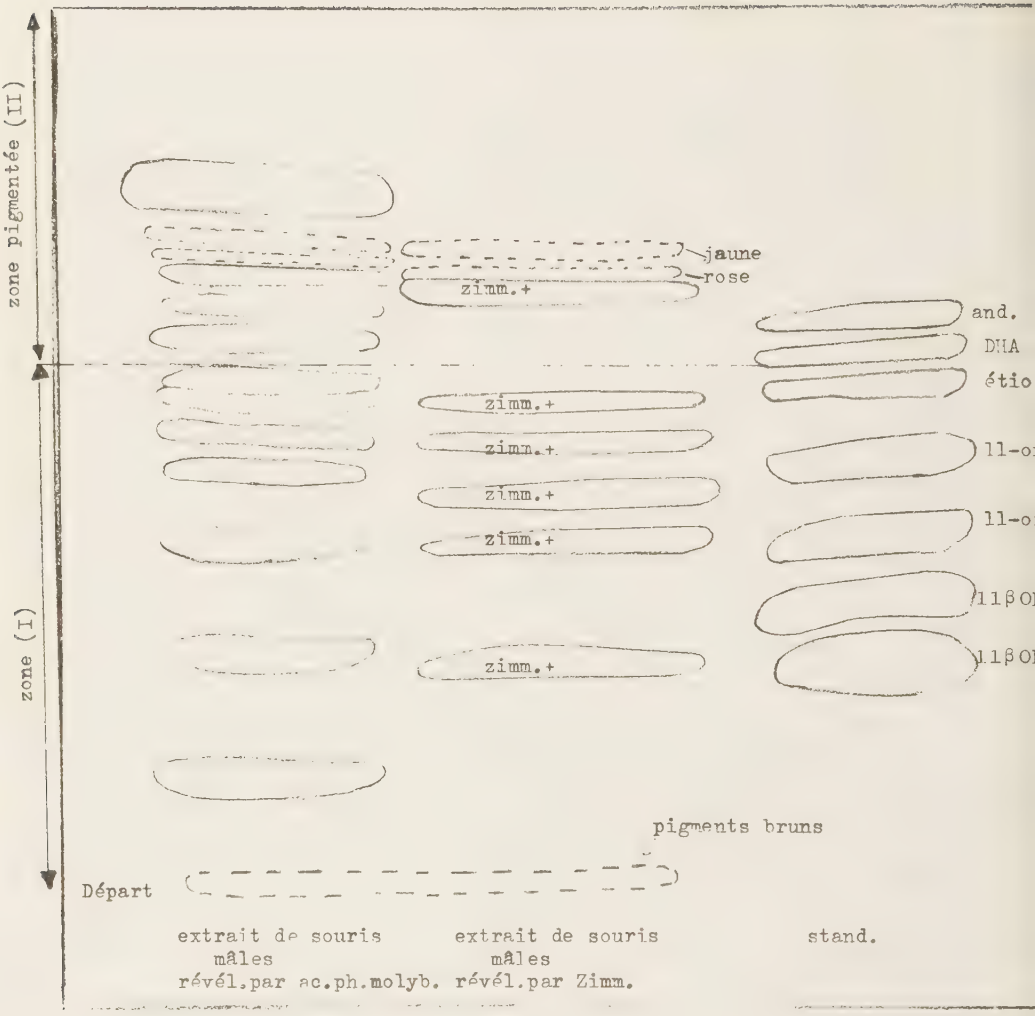
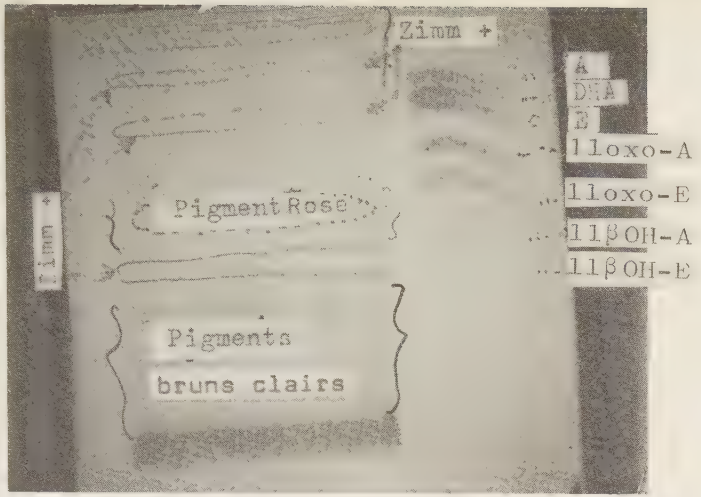


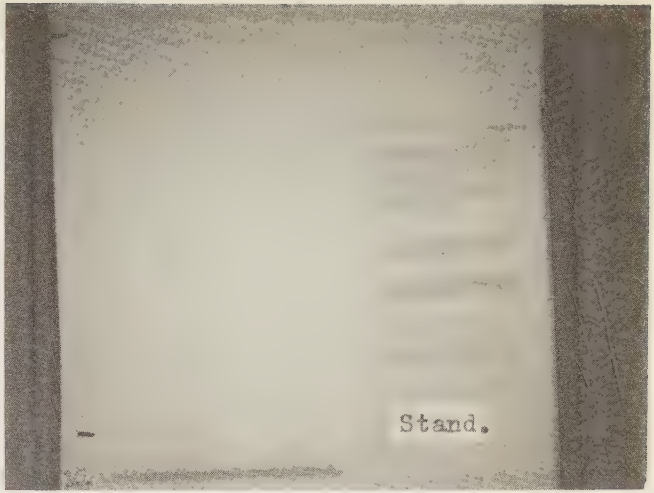
Figure I. 7
Schéma de séparation sur CCM d'un extrait urinaire de souris mâles après hydrolyse acide. Système de cuve saturée (chloroforme:éthanol 98:2) à développements multiples .



F solv. 2% méthanol Stand.

Fig.I.8

Séparation sur CCM d'un extrait urinaire de souris mâles, obtenu comme indiqué dans le texte . Système de cuve saturée(chloroforme:éthanol 98:2) à développements multiples .



F.solv. 5% méthanol

Fig.I.9

Même urine que Fig.I.8 . Extrait obtenu comme indiqué dans le texte. On note l'absence de toute tache dans cette fraction. Systéme de cuve saturée(chloroforme:éthanol 98:2) à développements multiples.

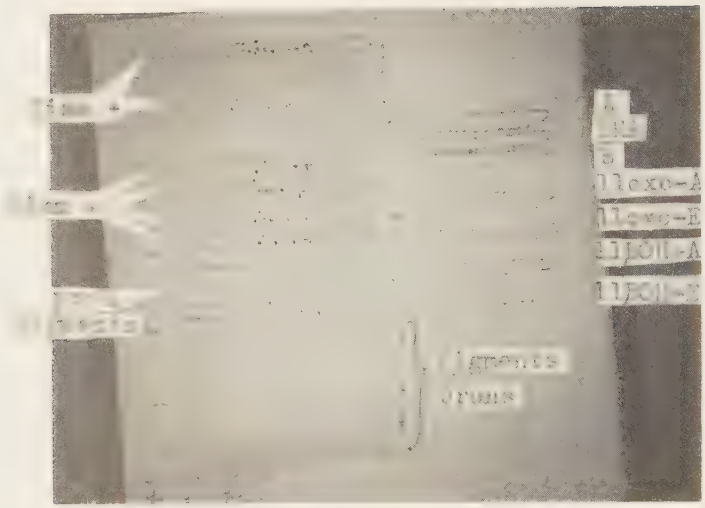


Fig.I.11

Séparation sur CCM de F gluc. Extrait urinaire de souris mâles préparé après extraction des conjugués par l'acétate d'éthyle. Système de cuve saturée (chloroforme:éthanol 98:2) à développements multiples .

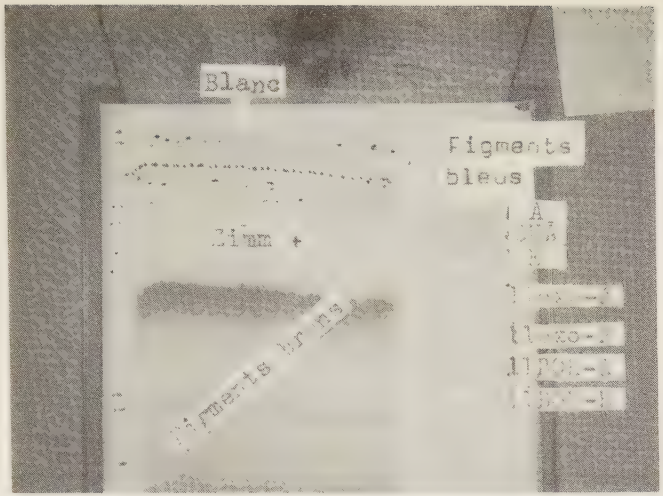


Fig.I.12

Séparation sur CCM de F solv. Extrait urinaire de souris mâles préparé après extraction des conjugués par l'amberlite XAD-2, suivie d'une solvolyse et hydrolyse enzymatique. Système de cuve saturée(chloroforme:éthanol 98:2) à développements multiples .

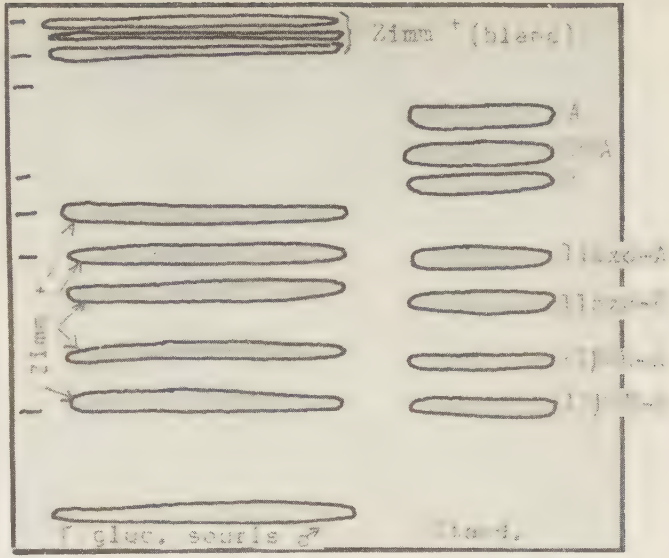


Fig.I.13

Séparation sur CCM de F gluc. Extrait urinaire de souris mâles préparé après extraction des conjugués par l'amberlite XAD-2, suivie d'une solvolyse et hydrolyse enzymatique. Système de cuve saturée (chloroforme:éthanol 98:2) à développements multiples.

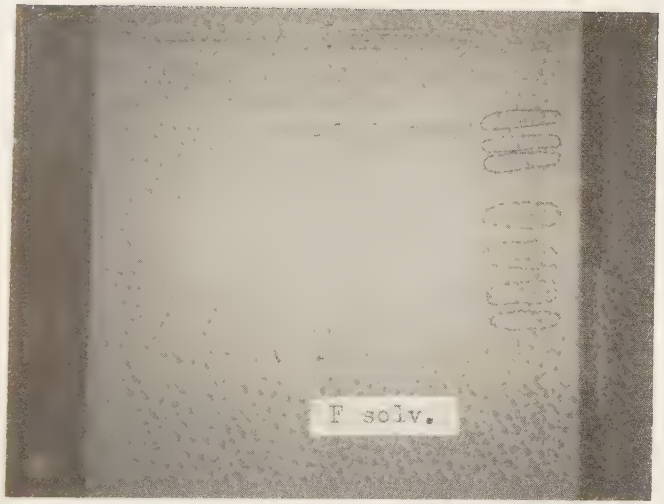


Fig.I.14

Séparation sur CCM de F solv. Extrait urinaire de souris mâles préparé après extraction des conjugués par l'amberlite XAD-2, suivie d'une hydrolyse enzymatique et solvolyse. Système de cuve saturée (chloroforme:éthanol 98:2) à développements multiples .

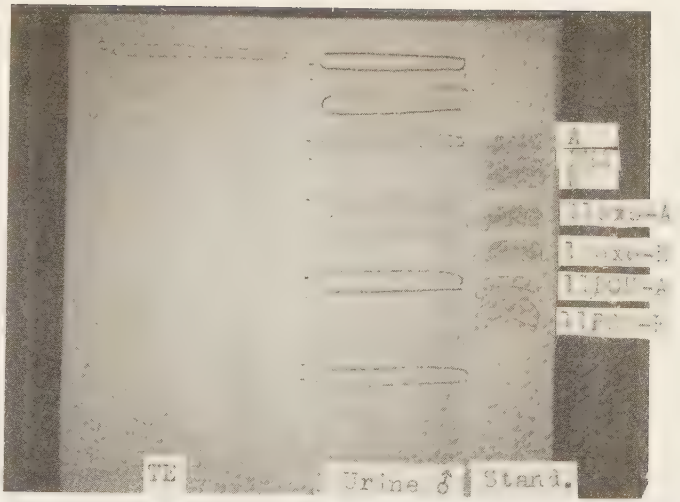


Fig.I.15

Séparation sur CCM de F gluc. Extrait urinaire de souris mâles préparé après extraction des conjugués par l'amberlite XAD-2, suivie d'une hydrolyse enzymatique et solvolyse . Système de cuve saturée (chloroforme:éthanol 98:2) à développements multiples .

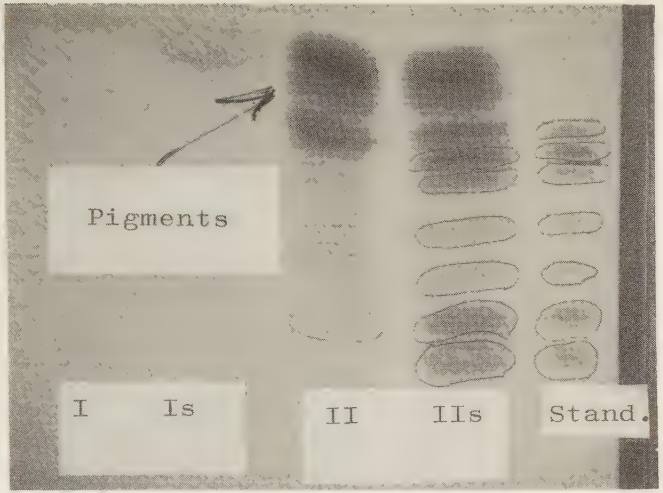


Figure I. 16

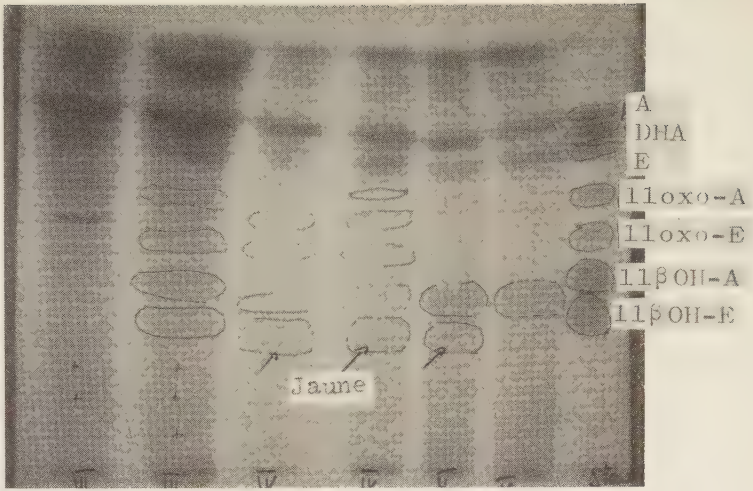


Figure I. 17

Fig.I.16 et I.17

Séparation sur CCM des fractions de la colonne d'alumine d'un extrait urinaire de souris mâles obtenu comme indiqué dans le texte.
s = urine surchargée.

C H A P I T R E II - Méthode choisie et étude critique

1° Introduction

En se basant sur les observations faites au chapitre précédent, nous avons décidé de préparer notre extrait urinaire de souris selon la méthode générale suivante :

1. Extraction des stéroïdes conjugués par la résine d'amberlite
2. Hydrolyse enzymatique (par hélicase) de l'extrait élué par le méthanol de la colonne précédente.

   Le choix de l'hélicase se justifie de la manière suivante : compte tenu des résultats obtenus par la chromatographie sur couche mince indiquant que les substances Zimmermann positives se trouvent essentiellement dans la fraction glucuronique, la fraction sulfatée est de ce fait quasi négligeable.

   Dans ces conditions, toutes les manipulations nécessitées par la solvolyse peuvent être remplacées par l'utilisation de l'hélicase qui contient tout à la fois la β-glucuronidase et des sulfatases. On économise ainsi du temps sans perturber fondamentalement la méthode et sans négliger pour autant les petites quantités de sulfoconjugués qui pourraient cependant s'y trouver.

3. Purification de l'extrait par une colonne d'alumine (38)
4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse.

2° Matériel et méthode de préparation des produits à utiliser

Produits :

1. Acétate d'éthyle p.a. distillé en présence de 1% de $CaCO_3$.
2. Méthanol p.a.
3. Ethanol p.a.
4. Chloroforme p.a. (stabilisé avec 1% d'éthanol)
5. Diméthyformamide spéciale pour CPG (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois)
6. Acétone p.a.

7. Tampon acétate 0,2 M (PH : 5,2)
8. Acide acétique glacial p.a.
9. NaOH 0,1 N
0. Hélix Pomatia (Hélicase) contenant de la β-glucuronidase et des sulfatases (Industrie Biologique Française - Genevillier /France)
1. Amberlite XAD-2 (BDH)
2. Alumine Woelm W-200, activité III.
3. BSTFA (N,O-Bis (trimethysilyl)-trifluoro-acétamide) Serva/ Allemagne
4. Stéroïdes de référence (Ikapharm) préparés dans l'éthanol (1 µg/ 1 µl)

Tous les solvants sont distillés avant l'emploi (Origine : Merck).

ériel

Colonne d'amberlite XAD-2

C'est une colonne en verre pyrex de 22 mm. de diamètre interne, munie d'un disque frité à grande porosité, d'un robinet en téflon et d'un réservoir (29/32) de 250 ml. La colonne est remplie en versant tout simplement l'amberlite XAD-2 en suspension dans l'eau (40 g. env.)

La colonne est renversée de bas en haut plusieurs fois de telle façon à ce que les bulles d'air qui apparaissent pendant le remplissage disparaissent. La hauteur de la résine est environ de 20 cm.

Traitement de l'amberlite avant son utilisation pour la première fois

Nous l'avons déjà mentionné, l'amberlite est une résine synthétique de polystyrène ayant comme propriété d'adsorber toute substance organique hydrosoluble.

Elle est livrée dans le commerce sous forme de granules hydratés à pH basique. Avant son emploi pour la première fois, il est important de la traiter par plusieurs lavages afin d'éliminer l'alcalinité et les "fines" qu'elle contient. Cette élimination des "fines" est une étape très

importante dans le bon fonctionnement de la colonne, car elle assure un diamètre homogène des granules d'amberlite. Les lavages successifs se font comme suit :

- l'amberlite est mise dans un bécher, lavée à l'eau distillée jusqu'à ce que le pH devienne neutre. A chaque lavage des "fines" restent en suspension et sont éliminées par aspiration
- l'eau est remplacée par l'éthanol. Les "fines" sont éliminés de la même manière
- un dernier lavage à l'eau est effectué afin d'éliminer l'éthanol
- la résine est ainsi prête à l'emploi.

Régénération de la colonne d'amberlite après utilisation

Certains auteurs préconisent la régénération de la colonne par un simple lavage à l'eau (130). Pour nos colonnes, nous avons suivi les lavages suivants :

- lavage par passage dans la colonne de 200-250 ml de H_2O distillée goutte à goutte. La colonne est renversée au cours de cette opération plusieurs fois pour assurer l'homogénéité;
- lavage par passage de 120-200 ml d'éthanol;
- lavage par pasaage de 100-150 ml d'acétone
- lavage par passage de 200-250 ml de H_2O dist.

La durée de vie de la colonne dépend de la fréquence de son utilisation. Elle peut être de 6-7 mois à base de deux utilisations par semaine (Gustaffson - communication personnelle)

2. Colonne d'alumine :

C'est une colonne en verre pyrex de 10 mm de diamètre interne, munie d'un rodage supérieur 19/23 sur lequel s'adapte un réservoir de 100 ml et d'un robinet en téflon.

Préparation de la colonne :

De la laine de verre est introduite à l'intérieur de la colonne. Cette dernière est remplie de benzène. L'alumine (6g) est pulvérisé à l'intérieur de la colonne (9). Après sédimentation de l'alumine, on tape légèrement la colonne avec une baguette recouverte de caoutchouc pour assurer un bon tassement et la formation d'une surface supérieure de l'adsorbant bien plane. Une pincée de sable purifié (Merck) est introduite avec précaution (env. 5 mm) afin d'empêcher la déformation de la surface lors de l'introduction de l'échantillon.

Finalement, la colonne est rincée avec 25-30 ml de benzène.

3. Chromatographe à gaz Carlo-Erba (Fractovap) à deux détecteurs à ionisation de flamme et un électromètre, muni d'une colonne 180- 0,3 cm et d'un enregistreur. La colonne est remplie d'un support Gas Chrom Q 100-120 mesh imprégné d'une phase OV-225 à 3% (applied Science Laboratories).

4. Verrerie de laboratoire courante (ampoule à décantation avec clé en téflon, tubes avec rodage, etc.)

5. Evaporateur rotatif Rotavapor (Büchli)

6. Bain-Marie à 37°

7. Etuve réglable

Méthode

I. Extraction des conjugués

100 ml. d'urine préalablement filtrée (papier filtre plissé) sont passés dans la colonne d'amberlite XAD-2 (goutte à goutte), de telle façon à ce que le débit ne dépasse pas 5 ml/min. La colonne est rincée avec 150 ml d'eau distillée (même débit). On laisse s'écouler l'eau complètement de la colonne et on applique un faible courant d'azote afin de chasser les traces d'eau.

La colonne est remplie avec du méthanol. L'élution se fait avec 200 ml du même solvant. Des pores apparaissent dans la colonne dus au passage eau-méthanol. Elles n'ontt pas d'effet sur l'élution.

La fraction méthanolique (jaune) qui contient les stéroïdes conjugués et d'autres substances organiques hydrosolubles est évaporée à sec (40-45°C).

2. Hydrolyse enzymatique

Le résidu contenant les stéroïdes conjugués est repris dans 25 ml de H_2O. Le pH est ramené à 5,4 et on ajoute 2,5 ml de tampon acétate à pH 5,4. On ajoute 1000 µ/ml d'urine d'hélicase et 3 gouttes de chloroforme. L'incubation se fait dans un bain-marie à 37°C pendant 24 h. en agitant le milieu d'incubation de temps en temps.

3. Extraction des stéroïdes libres

L'hydrolysat est laissé refroidir à la température de la pièce. Si un précipité se forme, on filtre sur filtre plissé. Le filtre est rincé avec 25 ml de H_2O, ce qui nous donne un volume total de 52,5 ml. S'il n'y a pas de précipitation, on complète l'hydrolysat au même volume avec de l'eau.

L'extraction se fait dans des ampoules à décantation de 250 ml à trois reprises avec l'acétate d'éthyle (3 x 50 ml). Chaque extraction dure 15 minutes sur l'agitateur de secousses; si une émulsion se forme, on centrifuge.

Les phases organiques sont réunies, lavées avec 1/10 volume de NaOH 0,1 n à trois reprises (15 minutes d'agitation), puis à l'eau distillée jusqu'à la disparition de l'alcalinité (1/10 volume, 5 minutes d'agitation).

L'acétate d'éthyle est deshydraté en ajoutant dans l'ampoule à décantation 2-3 pincées de Na_2SO_4 anhydre. On filtre sur Whatmann no. 1 en mettant dans le papier une spatule de Na_2SO_4. Le filtre est rincé avec 2 x 5ml d'acétate d'éthyle et on évapore à sec à 40-45°C.

4. Purification de l'extrait sur colonne d'alumine

L'extrait sec est repris dans 5 ml de benzène. On l'introduit dans la colonne d'alumine au moyen d'une pipette Pasteur. On rince avec 2 x 4ml de benzène. Toute la quantité de benzène qui quitte la colonne est écartée.

L'élution se fait comme suit :

Fraction I	= 25 ml	de benzène			
Fraction II	= 70 ml	de benzène	contenant	0,5%	d'éthanol
Fraction III	= 10 ml	"	"	1,0%	"
	10 ml	"	"	3,0%	"
	10 ml	"	"	5,0%	"
	20 ml	"	"	10,0%	"
	20 ml	"	"	20,0%	"

Toutes les fractions sont évaporées à sec (40-45°C).

5. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

Transformation en TMSi (triméthylsilyl)

Le résidu de chaque fraction est repris dans 50µl de DMF et 150 µl de BSTFA. On laisse incuber toute la nuit dans un dessicateur à la température du laboratoire. 1-2µl sont injectés dans le chromatographe.

Analyse quantitative (référence)

La quantification s'effectue par rapport à un mélange standard (0,25 - 0,50 µg/µl), en calculant la surface des pics par la formule :

surface = hauteur (mm) x largeur à mi-hauteur (mm)

Une injection du mélange est faite avant de commencer une série d'analyse et une seconde injection à la fin de l'analyse.

Conditions chromatographiques

Colonne : 180 x 0,3 cm remplie de OV-225 à 3%
Température de la chambre d'injection : 280 °C
Température de la colonne : 220 °C
Débit du gaz vecteur : 1,0 kg/cm^2
Débit de l'air : 1,1 kg/cm^2
Débit de l'hydrogène : 1,3 kg/cm^2
Vitesse de l'enregistreur : 5 mm/ minute

Ces conditions opératoires sont valables seulement pour l'analyse de l'urine humaine sur une colonne OV-225 à 3%. Comme nous les verrons ultérieurement, elles seront modifiées avec l'urine de souris chromatographiée sur d'autres phases stationnaires.

Analyse qualitative

L'identification des pics de chaque stéroïde s'effectue d'après le paramètre de nombre stéroïdique (N.S.) défini par Vandenheuvel.

3° Etude détaillée de certaines étapes de la méthode

3.1. Détermination du volume optimal d'élution des stéroïdes libres et conjugués, préalablement adsorbés sur la colonne d'amberlite XAD-2.

Un mélange de 50 µg de chacun des stéroïdes suivants est ajouté à 100 ml de H_2O : androstérone-glucuronide, 11βOH-androstérone-glucuronide, DHA-sulfate, pregnenolone-sulfate, étiocholanolone et 11-oxo-étiocholanolone. Après adsorption sur la colonne d'amberlite XAD-2, les stéroïdes sont élués par fractions de 2 x 100 ml et de 2 x 50 ml de méthanol.

Chaque fraction est évaporée à sec. Le résidu est repris dans 25 ml de H_2O, hydrolysé enzymatiquement par l'hélicase (500 unités/ml) et analysé par la chromatographie en phase gazeuse, selon la technique proposée. Dans une seconde manipu-

lation, toutes les phases aqueuses sortant de la colonne (100 ml contenant les stéroïdes + 150 ml d'eau de rinçage de la colonne) sont réunies en une seule fraction : F_{XAD-2} aqueuse.

Le pH de cette fraction est ramené à 1,0 avec l'acide sulfurique 50%. Après addition de NaCl (20 g/100 ml d'urine), elle est extraite à trois reprises par l'acétate d'éthyle (1 x 1 vol; 2 x 1/2 vol.). Chaque extraction dure 15 minutes à l'agitateur de secousses.

L'acétate d'éthyle est évaporé à sec et le résidu est hydrolysé par l'hélicase en même temps que les quatre fractions méthanoliques de l'élution.

L'analyse de cette fraction permet en somme de vérifier si l'adsorption des stéroïdes par la colonne d'amberlite était complète ou non.

Résultats : (fig. II.1 et II.2.)

L'analyse chromatographique en phase gazeuse montre que tous les stéroïdes adsorbés sont pratiquement élués par la première fraction de 100 ml de méthanol.

On note l'absence totale de pics dans les chromatogrammes des fractions suivantes.

Donc, il suffit d'environ 100 ml de méthanol pour éluer les stéroïdes libres et conjugués de la colonne.

Or, dans la technique proposée, nous employons 200 ml de méthanol pour augmenter la marge de sécurité assurant ainsi une élution totale des stéroïdes urinaires. La fraction XAD-aqueuse ne donne pas de pics sur le chromatogramme. Ces résultats nous autorise de conclure que l'adsorption des stéroïdes sur la colonne était complète.

3.2. Détermination des conditions optimales de l'hydrolyse par l'hélicase : effet de la concentration de l'enzyme, du pH et du temps d'incubation

L'étude de ces paramètres est effectuée sur une urine humaine de 24 h.

1000 ml de cette urine sont passés dans une colonne d'amberlite (env.40 g) par fractions de 250 ml. La colonne est rincée avec environ 400 ml d'eau. Les stéroides sont élués par environ 500 ml de méthanol.

Après évaporation du méthanol, les résidus de quatre fractions sont réunis et repris dans 250 ml d'eau distillée. Ce volume est congelé immédiatement par fractions de 5 ml. Donc, chaque fraction (urine-XAD) correspond à 20 ml d'urine réelle.

3.2.1 Effet de la concentration de l'enzyme et du pH.

5 ml d'urine-XAD (20 ml d'urine réelle) sont complétés à 50 ml avec de l'eau distillée. Le pH de la solution est ramené à la valeur désirée du pH avec NaOH 1N (le pH de l'urine-XAD est approximativement 3,8; l'urine normale a généralement un pH de 5,4-5,6). Après addition du tampon acétate (0,2 M), l'hélicase est ajoutée à des concentrations allant de 500 à 6000 unités de β-glucuronidase par ml d'urine. L'incubation et l'extraction se font selon la méthode proposée.

Résultats :

Les résultats sont résumés dans le tableau II.1

3.2.2 Effet de la durée d'incubation.

Dans la plupart des méthodes qui font appel à l'hydrolyse enzymatique par l'hélicase des 17-oxo-stéroides urinaires, le temps d'incubation varie généralement de 24 à 48 h. (68)(9).

Pour nos essais, nous avons choisi de comparer les deux durées extrêmes précitées pour l'hydrolyse d'une urine humaine de 24 h.

5 ml d'urine-XAD (20 ml d'urine réelle) sont complétés à un volume de 50 ml avec l'eau distillée. Le pH de la solution est ramené à 5,4 avec NaOH 1N. On ajoute 1/10 volume du tampon acétate(0,2 M) et 1000 unités de β-glucuronidase (hélicase) par ml d'urine. L'incubation est faite à 37 °C pendant 24 h et 48 h.

Résultats :

Les résultats sont résumés dans le tableau II.2.

Résultats: Tableau II.1.

Les résultats de ces analyses sont donnés dans le tableau suivant:

pH	hélicase unité/ml	500	1000	3000	5000	6000
4,2	$C_{19}O_2$	236.8	239.9	233.6	204.3	215.1
	$C_{19}O_3$	74.6	60.4	57.9	54.3	60.2
	Totaux	311.4	300.6	291.5	258.7	275.3
4,6	$C_{19}O_2$	219.4	234.7	243.0	206.2	229.2
	$C_{19}O_3$	52.4	46.7	53.3	54.3	56.3
	Totaux	271.9	281.4	296.2	260.5	285.5
4,8	$C_{19}O_2$	257.6	264.2	237.7	209.0	220.2
	$C_{19}O_3$	56.3	53.6	49.8	50.3	48.0
	Totaux	285.5	311.2	314.0	288.0	257.0
5,2	$C_{19}O_2$	281.4	285	228.6	258.1	254.1
	$C_{19}O_3$	47.2	49.7	47.0	53.7	55.8
	Totaux	328.6	334.6	275.6	311.8	309.9
5,4	$C_{19}O_2$	258.2	315.2	294.0	262.8	-----
	$C_{19}O_3$	53.1	60.6	56.5	52.1	-----
	Totaux	311.2	375.8	350.5	315.0	-----

Tableau II.1.: effet de la concentration en hélicase sur l'hydrolyse des stéroides conjugués dans 20 ml d'urine humaine et pour différents pH d'incubation.
Les chiffres représentent le nombre de µg de stéroides dans 20 ml d'urine. Pour calculer le taux en mg/24 h, multiplier par 0,055.
Chaque valeur est la valeur moyenne de deux analyses chromatographiques.

	Temps d'incubation en h					
	24 h.			48 h.		
	Essai I	Essai II	Moyenne	Essai I	Essai II	Moyenne
Androstérone	81.55	78.67	80.11	75.45	83.92	79.69
Etiocholanolone	82.87	89.14	86.01	74.75	84.80	79.78
DHA	160.29	156.01	158.15	139.54	160.49	150.02
11-oxo-androstérone	23.24	23.63	23.44	25.01	27.43	26.22
11-oxo-étiocholanolone	8.99	7.28	8.14	8.33	8.20	8.27
11β-OH-androstérone	3.77	4.57	4.17	6.57	7.67	7.12
11β-OH-étiocholanolone	7.26	8.64	7.95	7.78	9.77	8.78
$C_{19}O_2$	330.98	317.55	324.27	289.74	329.21	309.48
$C_{19}O_3$	43.26	44.12	43.69	47.69	53.07	50.38
Totaux	374.24	361.27	367.95	337.43	382.28	359.86
Pregnandiol	15.15	14.67	14.91	16.36	18.90	17.63
Pregnantriol	24.75	26.53	25.64	28.15	27.31	27.73

Tableau II.2. - Variation du taux des 17-oxo-stéroïdes, du pregnandiol et du pregnantriol urinaires, en fonction du temps d'incubation (24 et 48h.) à 37°C
Hydrolyse par l'hélicase (1000 unités /ml urine)

3.3 Etude de récupération de stéroides ajoutés à l'urine et à l'eau.

Dans une première série d'essais, nous avons étudié la récupération de stéroides libres et conjugués de référence surajoutés à une urine humaine.

Dans une seconde série d'essais, les mêmes opérations sont faites avec le même volume en eau.

Dans les deux cas, l'urine et l'eau surchargées sont extraites à l'amberlite XAD-2. Les résidus sont hydrolysés à pH 5,4 dans le cas de l'urine et aux pH 5,4 et 4,8 dans le cas de l'eau.

Résultats :

Les résultats sont résumés dans le tableau II.3

3.4 Reproductbilité de la méthode sur une urine humaine.

La reproductibilité de la méthode a été étudiée par l'analyse d'une urine humaine provenant d'un homme de 20 ans en bonne santé. Le volume urinaire total de 24 h (1980 ml) a été séparé en 12 échantillons d'égal volume (20 ml).

Résultats :

Les résultats sont résumés dans le tableau II.4.

	urine(pH 5.4)* n=4				eau (pH 5,4),n=12				eau (pH 4,8), n=8			
Stéroides	µg sur.	µg réc.	S.D	%	µg sur.	µg réc.	S.D	%	µg sur.	µg réc.	S.D	%
Etiocholanolone	20	21.2	2.4	106.3	50	43.1	2,5	82.6	50	42,7	4,9	85,4
11-oxo-androstérone	--	----	---	-----	50	41.8	3.1	83.6	--	----	---	----
11-oxo-étiocholanolone	--	----	---	-----	--	----	---	----	50	41.5	2.7	83.0
Pregnandiol	20	15.1	3.1	75.5	--	----	---	----	---	----	---	----
pregnantriol	20	17.9	1.4	89.7	--	----	---	----	---	----	---	----
DHA-sulfate	13.5	10.5	0.9	77.6	33.8	22.9	2.3	67.7	33.8	26.6	5.7	78.7
Pregnenolone-sulfate	--	----	---	----	37.8	18.2	4.0	48.1	37.8	20.2	2.6	53.4
Androstérone-glucuronide	12.4	7.4	1.1	59.4	31.1	13.1	1.6	42.1	31.1	15.0	1.2	48.2
11βOH-androstérone-glu-ronide.	12.7	5.2	0.9	41.0	31.7	22.2	2.3	70.0	31.7	29.6	3.7	93.4

Tableau II.3. : Taux de récupération des stéroides libres et conjugués ajoutés à une urine mâle et à l'eau.

Stéroïdes	mg/24h.	écart-type	intervalle de confiance
Androstérone	1.84	0.10	0.06
Etiocholanolone	2.35	0,13	0.08
DHA	0.17	0.02	0.01
11-oxo-andro.	0.84	0.09	0.06
11-oxo-étioch.	0.52	0.03	0.02
11β-OH-andro.	0.76	0.06	0.04
11β-OH-étioch.	0.49	0.07	0.04
$C_{19}O_2$	4.36	0.16	0.10
$C_{19}O_3$	2.61	0.15	0.10
Totaux	6.97	0.28	0.18

Tableau II.4 : Reproductibilité de la méthode sur une urine humaine (n = 12)
L'intervalle de confiance est calculé pour une probabilité de 95%.

4° Discussion - Etudes critiques

L'extraction des stéroïdes conjugués du milieu aqueux par la colonne d'amberlite est un procédé qui présente en réalité plusieurs avantages :

1. Cette résine permet en effet une extraction de grands volumes en une seule percolation urinaire, permettant ainsi de concentrer des taux très faibles de substances qui y sont dissoutes.

   L'adsorption des stéroïdes conjugués par cette résine est quasi complète. Plusieurs auteurs ont démontré ceci par une surcharge de stéroïdes marqués comme la 3H-DHA-sulfate et en mesurant la radioactivité des phases aqueuses sortant de la colonne. Leurs résultats ont démontré l'absence de la radioactivité de ces phases (15)(10-11)(130)(128).

De notre côté, nous avons vérifé ce point par une méthode chromatographique de loin moins sensible que les méthodes radioactives. Le chromatogramme de la fraction XAD-$2_{aqueuse}$ obtenu nous a montré l'absence totale de pics correspondant aux stéroïdes prélablement surchargés.

L'élution par le méthanol assure une élution des stéroïdes conjugués avec un volume environ égal au volume urinaire. L'élution est totale. Nous citons à titre de référence les récupérations de la colonne de XAD-2 obtenues par Moore (121), par Shakleton (127) et par Vinnikka et Jäune (129) qui ont obtenu pour la DHA-sulfate marquée 90.6 $\pm$ 5,4 %; 90,0 $\pm$ 9,0% et 94,0 % respectivement.

2. Un autre avantage important de la colonne d'amberlite est le fait que cette résine sépare de l'urine les inhibiteurs enzymatiques dont la concentration varie d'une urine à une autre, en particulier les ions minéraux, tels que les phosphates et les sulfates, responsables en partie de l'inhibition.

Au cours de nos essais, nous avons comparé par l'analyse en chromatographie en phase gazeuse deux urines dont l'une est passée sur l'amberlite XAD-2 et suivie d'une hydrolyse et l'autre subissant une hydrolyse sans extraction préalable.

Les chromatogrammes de la fig. (II.3) nous montrent l'effet extrêmement net d'une extraction à l'amberlite sur l'apparition du pic de la DHA. Dans notre exemple, l'absence de cette dernière dans l'urine qui n'a pas subi une extraction est due probablement à la présence des inhibiteurs des sulfatases. Faucette et Cowley ont trouvé qu'avec l'amberlite le taux de récupération de la DHA est doublé.

L'examen des résultats de l'hydrolyse enzymatique d'une urine en fonction de différentes concentrations d'hélicase

et à différents pH d'incubation nous montre :

1. Avec l'augmentation de la concentration enzymatique (unités/ml), le taux des 17-oxo-stéroïdes obtenu n'est pas significativement différent d'une concentration à une autre (test t de Student). On notera cependant que des valeurs situées au voisinage de 1000 unités/ml donnent un taux généralement plus élevé.

2. Le pH d'incubation enzymatique exerce un effet sur le taux des 17-oxo-stéroïdes obtenu. On constate qu'il existe effectivement une différence significative entre les pH 4,2 et 5,4; 4,6 et 5,4; 4,8 et 5,4 (t = 2,95; 3,90 et 2,63).

   Par contre, entre les pH 5,2 et 5,4 on n'observe pas de différence significative.

   Ce résultat rejoint en somme les résultats de la littérature qui donnent un pH maximal pour l'hélicase de 5,2.

3. Le tableau (II.2) montre que pratiquement il n'y a pas de différence entre une hydrolyse effectuée pendant 24h. ou 48h.

Le tableau (II.3) nous montre qu'avec la méthode utilisée, le taux de récupération des 17-oxo-stéroïdes dépend de l'état de conjugaison ou non conjugaison de ces stéroïdes.

On constate que la moyenne générale des taux de récupération des stéroïdes libres dans les conditions précitées est de 86,6%.

Par contre, la moyenne générale des taux de récupération des 17-oxo-stéroïdes conjugués est de 55,1% pour les sulfo-conjugués et de 59,0% pour les gluco-conjugués.

On note plus de dispersion dans les valeurs des stéroïdes conjugués que dans les valeurs des stéroïdes libres.

Si l'on considère la moyenne générale des taux récupérés de la DHA-sulfate seule, on constate qu'elle est de 74,7 %. Cette valeur est proche de certaines valeurs citées dans la littérature.

En résumé, on peut considérer la récupération des stéroïdes libres comme bonne; la moins bonne récupération des conjugués peut être attribuée très probablement à une hydrolyse enzymatique incomplète.

Le tableau (II.4) nous montre que les résultats d'analyses répétées sur une même urine donnent des intervalles de confiance ($I = \frac{s}{\sqrt{n}} t_{0,05}$, pour une probabilité de 95%. s = écart-type) satisfaisants.

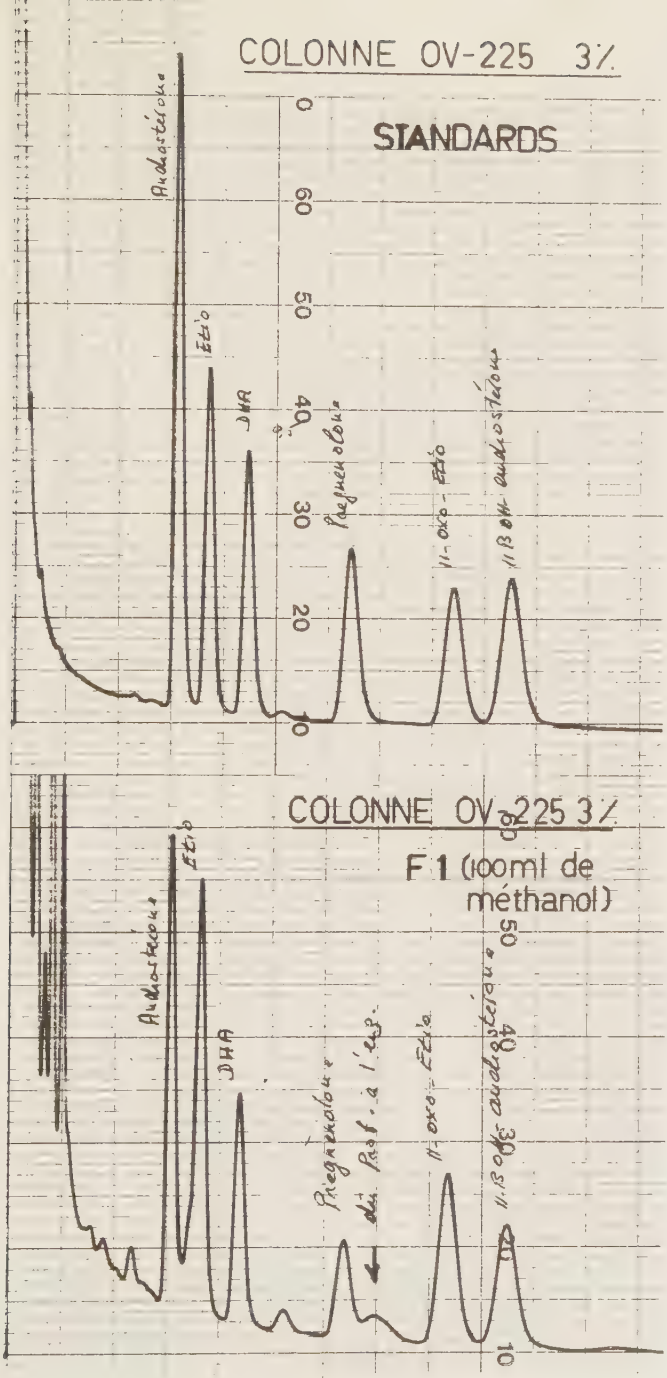


Fig.II.1 :

Chromatogramme de la fraction F_1 méthanolique de la colonne d'amberlite démontrant que tous les stéroïdes ajoutés sont élués avec 100 ml de ce solvant.

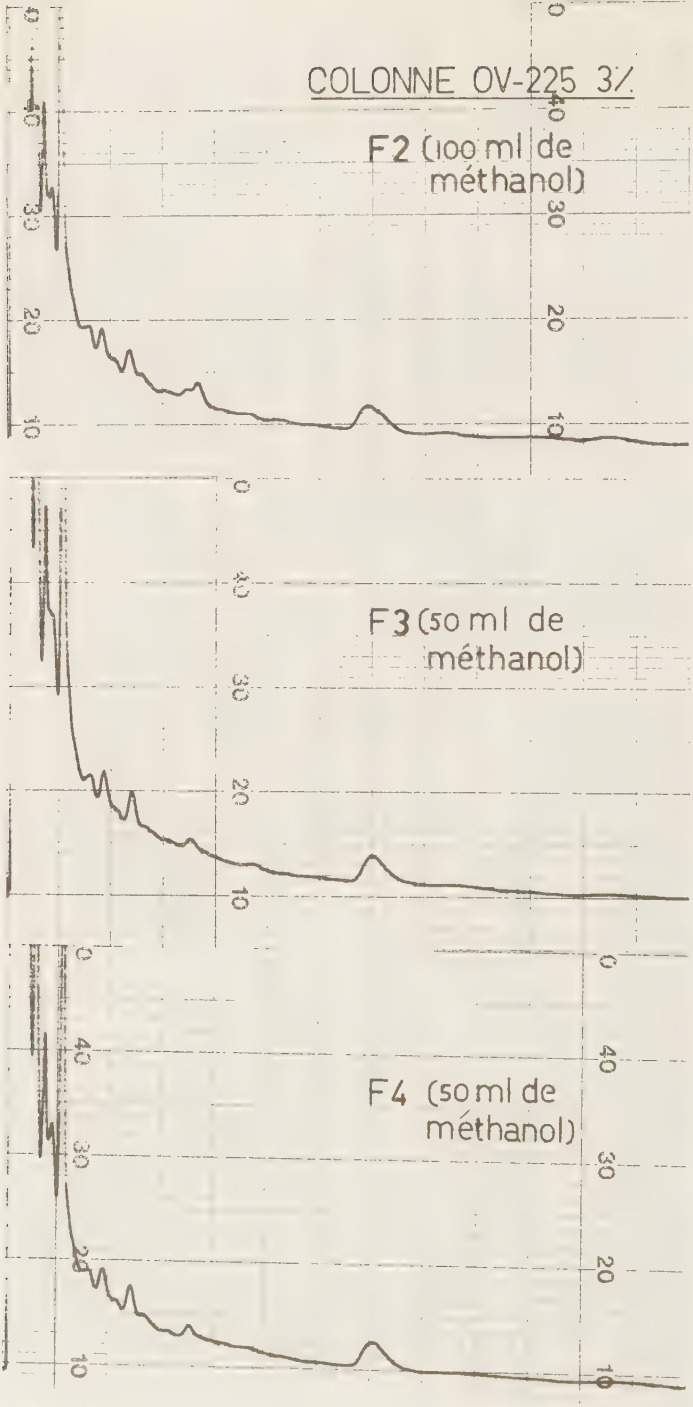
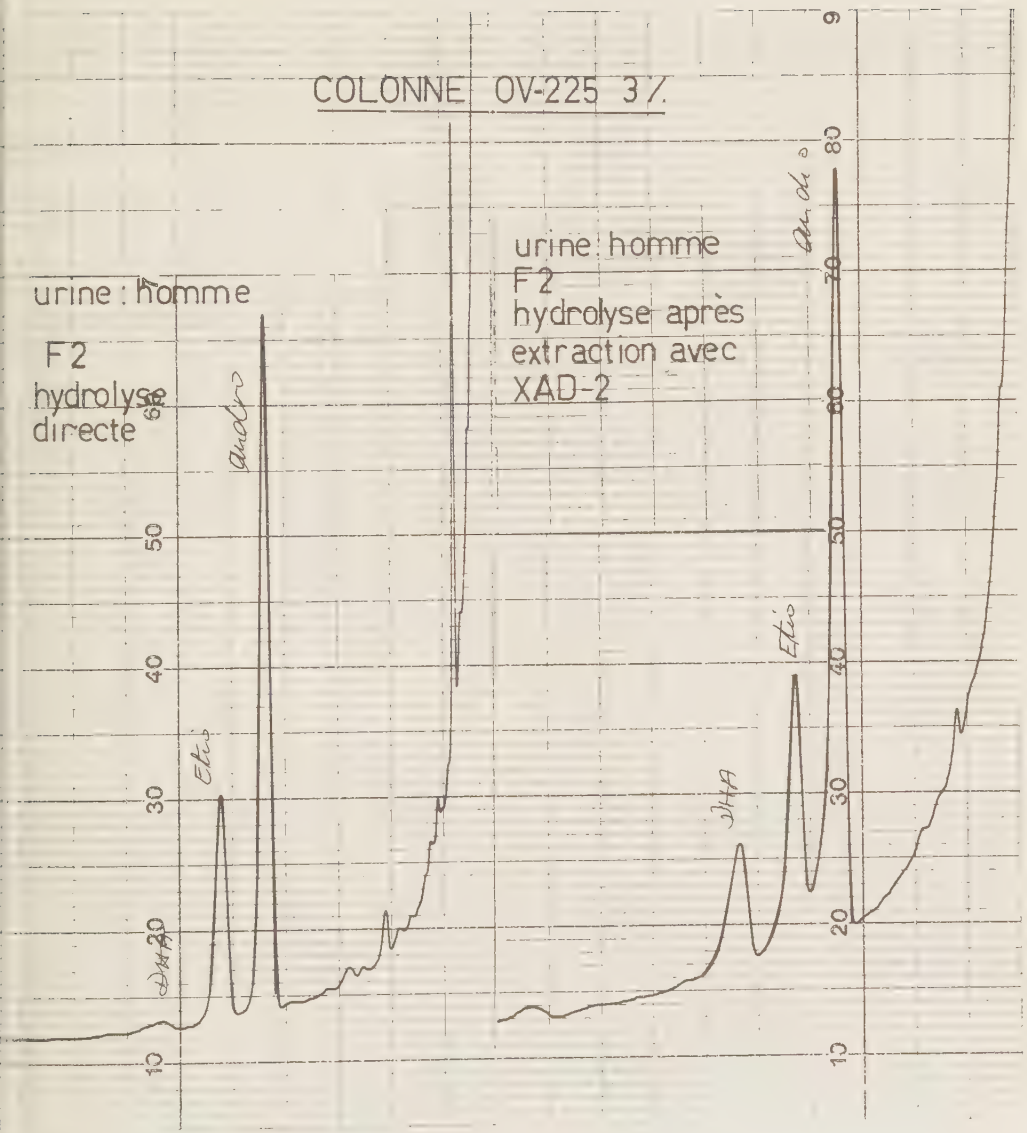


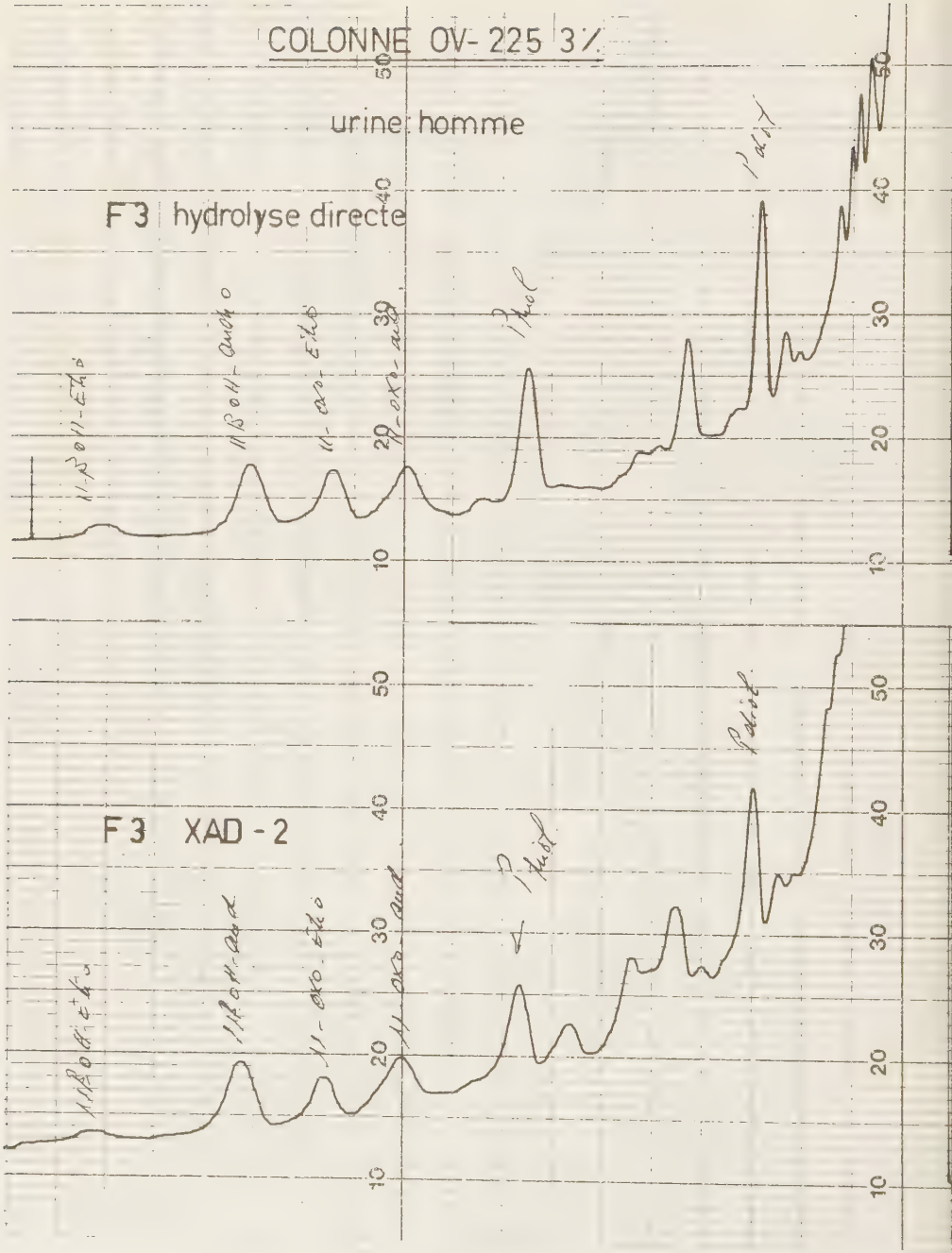
Fig.II.2 :

Chromatogrammes des fractions F_2, F_3 et F_4 de la colonne d'amberlite démontrant l'absence des pics correspondant aux stéroïdes ajoutés.



g. II.3

paration des $C_{19}O_2$ sur colonne OV-225 3% d'un extrait
ovenant des urines d'un homme adulte avec et sans extra-
on par la colonne d'amberlite.
aque chromatogramme correspond à la fraction F_2 de la
onne d'alumine .


COLONNE OV- 225 3%
urine homme
F 3 hydrolyse directe
F 3 XAD - 2

CHAPITRE III - Applications biologiques: Recherches sur les variations physiologiques et physiopathologiques des stéroides urinaires.

1° Etude de la variation des 17-oxo-stéroides urinaires, du pregnandiol et du pregnantriol en fonction du sexe et de l'âge chez l'homme.

En guise d'introduction à ce chapitre et en continuation directe du chapitre précédent, nous avons effectué le dosage des 17-oxo-stéroides par la méthode choisie sur l'ensemble du personnel du laboratoire.

Chaque urine est extraite par la colonne d'amberlite par fraction de 100 ml. L'hydrolyse enzymatique est faite sur une aliquote équivalente à 25 ml d'urine réelle (duplicata).

Résultats :

Les chromatogrammes de la figure III.1 et III.2 nous montrent un exemple de séparation de ces stéroides sur colonne OV-225 à 3 %.

Les résultats quantitatifs, calculés par rapport à un standard externe, sont résumés dans les tableaux III.1 et III.2.

Discusssion :

La comparaison statistique des quantités moyennes de 17-oxo-stéroides urinaires obtenues dans le groupe des hommes par rapport au groupe des femmes (test t) montre qu'il existe une différence sexuelle significative de l'androstérone et de l'étiocholanolone, ces deux substances étant plus élevées chez l'homme que chez la femme.

Pour les autres stéroides étudiés, le test t n'est pas significatif. On note cependant que la différence sexuelle des 17-oxo-stéroïdes totaux est à la limite de la signification, ($p = 0,1$).

	mg de stéroïdes/urine de 24h.								
urine	I	II	III	IV	V	VI	VII	X	s
âge (ans)	18	22	25	29	31	34	44		
Androstérone	2.63	1.84	2.89	1.94	2.33	1.30	2.05	2.14	0.
Etiocholanolone	1.95	2.35	6.17	5.11	5.43	3.86	2.51	3.90	0.
D H A	1.09	0.17	1.33	1.17	0.70	0.76	0.22	0.78	0.
11-oxo-androstérone	0.63	0.84	2.81	1.32	1.14	0.86	--	1.27	0.
11-oxo-étiocholan.	0.37	0.52	1.30	0.82	1.16	0.52	0.62	0.76	0.
11β-OH-androstérone	0.46	0.73	0.48	0.41	0.63	0.35	0.65	0.52	0.
11β-OH-étiocholan.	0.21	0.49	0.44	0.70	0.90	0.52	1.03	0.62	0.
$C_{19}O_2$	5.67	4.36	10.39	8.22	8.46	5.92	4.78	6.82	0.
$C_{19}O_3$	1.67	2.58	5.03	3.25	3.83	2.25	2.30	3.17	0.
Totaux	7.34	6.94	15.42	11.47	12.29	8.17	7.08	9.99	1.
Pregnandiol	0.48	--	0.86	0.71	1.30	0.36	0.62	0.72	0.
Pregnantriol	1.22	0.98	1.05	1.36	1.44	0.63	2.14	1.27	0.

Tableau III.1 : Fractionnement des 17-oxo-stéroïdes, du pregnandiol et du pregnantriol urinaires chez 7 hommes adultes. Extraction des conjugués par l'amberlite. Hydrolyse enzymatique par hélicase (1000 U/ml), 24 h à 37°C. Purification de l'extrait par colonne d'alumine.

x = valeur moyenne ; $s_m = \frac{s}{\sqrt{n}}$

	mg de stéroïdes /urine de 24h.									
urine	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	X	s_m
âge (ans)	17	19	22	25	28	46	48	55		
drostérone	1.08	1.40	2.24	1.19	2.00	1.27	1.71	0.35	1.41	0.21
iocholanolone	1.81	1.89	2.44	3.43	4.25	2.86	1.44	1.41	2.44	0.36
H A	0.08	2.75	0.22	0.19	0.51	1.22	1.43	--	0.92	0.34
α-oxo-andro.	0.22	0.59	2.65	0.70	1.40	1.03	0.36	0.38	0.92	0.28
β-oxo-étioch.	0.54	0.41	1.22	1.06	1.21	0.62	0.87	0.60	0.81	0.11
α-OH-andro.	0.29	0.21	0.65	0.19	0.78	0.41	0.43	0.22	0.40	0.08
β-OH-étioch.	0.35	0.46	0.62	0.79	0.94	0.65	0.51	0.63	0.62	0.07
$\Delta^{9}O_2$	2.97	6.04	4.90	4.81	6.76	5.35	4.58	1.76	4.77	0.57
$\Delta^{9}O_3$	1.40	1.67	5.14	2.74	4.33	2.71	2.17	1.83	2.75	0.47
otaux	4.37	7.71	10.04	7.55	11.09	8.06	6.75	3.59	7.40	0.90
egnandiol	0.48	0.36	5.71	0.89	3.27	0.60	0.52	0.35	1.51	0.68
egnantriol	0.63	0.29	1.05	1.11	1.41	0.35	0.71	0.19	0.71	0.16

ableau III.2 : Fractionnement des 17-oxo-stéroïdes, du pregnandiol et du pregnantriol urinaires chez 8 femmes adultes. Extraction des conjugués par l'amberlite. Hydrolyse enzymatique par hélicase (1000 U/ml), 24h. à 37°C. Purification de l'extrait par colonne d'alumine.

x = valeur moyenne $\quad s_m = \frac{s}{\sqrt{n}}$

En regroupant les résultats obtenus en fonction de l'âge (tableaux III.1 et III.2) on peut faire les remarques suivantes

1) la méthode choisie donne des résultats qui sont en accord avec ceux donnés par divers auteurs avec d'autres techniques d'analyse par la CPG (Tableau III.3) sur urines humaines.

2) Comme le montre la figure III.3, les valeurs trouvées évoluent bien dans le sens observé chez l'homme par tous les auteurs (137)(138).

Tableau III.

en mg de stéroïdes/ urine de 24h.

Auteur	Trafford (134)		Desgres (68)	Qutub (139)		Kirschner (76)		Tanner (133)	notre méthode ( )	
Sexe	H	F	H + F	H	F	H	F	H	H	F
Age	19-30	19-30	-----	34	29	----------		19-21	18-44	18-55
Stéroides										
androstérone	4.72 ±1.75	2.80 ±0.98	2.69	3.38 ±1.19	1.93 ±0.86	2.6	1.4	4.01	2.14 ±0.20	1.41 ±0.21
étiocholanol.	4.07 ±1.63	2.81 ±0.79	2.20	2.43 ±1.06	2.10 ±0.92	2.5	1.8	2.87	3.90 ±0.64	2.44 ±0.36
DHA	-----	-----	1.27	1.06 ±0.87	0.94 ±1.27	0.72	0.56	----	0.78 ±0.17	0.91 ±0.34
11-oxo-and.	1.86 ±0.94	1.06 ±0.74	1.37	0.35 ±0.16	0.34 ±0.23	----	----	0.75	1.27 ±0.32	0.92 ±0.28
11-oxo-étioch	0.85 ±0.57	0.79 ±0.55	1.07	0.41 ±0.26	0.49 ±0.23	0.54	0.48	0.91	0.76 ±0.13	0.81 ±0.11
11β-OH-and.	-----	-----	1.50	1.11 ±0.42	0.65 ±0.36	0.46	0.27	----	0.52 ±0.05	0.40 ±0.08
11β-OH-étioch.	-----	-----	1.02	0.35 ±0.23	0.28 ±0.15	0.39	0.43	----	0.62 ±0.11	0.62 ±0.07
Totaux	11.5 ±3.8	7.4 ±2.1	11.11	9.09 ±3.19	6.64 ±3.11	7.21	4.94	8.50	9.99 ±1.24	7.40 ±0.90
Pregnanediol	0.61 ±0.38	0.92 ±1.16	○8.30	0.70 ±0.32	1.67 ±1.31	0.41	0.55	----	0.72 ±0.13	1.51 ±0.68
Pregnanetriol	-----	-----	3.00	0.97 ±0.37	0.63 ±0.26	0.89	0.77	----	1.27 ±0.18	0.71 ±0.16

2° Etude de la variation des 17-oxo-stéroïdes urinaires et d'autres stéroïdes dans l'urine de souris

2.1. Application de la méthode choisie à l'urine de souris

2.1.1. Prélèvement urinaire chez la souris

I. Animaux

Nous avons utilisé des souris albinos mâles et femelles de la race $R_{III/Nm}$ (origine Paris-Dobrovolskaia).

Cette couche est connue pour sa relativement haute fréquence de tumeurs mammaires spontanées (environ 20% chez les femelles).

Les animaux sont logés dans des cages en "makrolon" à raison de 20 animaux par cage. Ils reçoivent une nourriture standardisée sous forme de granulés fournis par la maison Protector (Suisse) et de l'eau ad libitum.

L'animalerie est climatisée à une température de 20°C et à une humidité de 50-60%. L'éclairage est donné par de la lumière artificielle durant 12h. chaque jour de l'année (7h. à 19h.)

II. Prélèvement urinaire en cages métaboliques

Des cages métaboliques en PVC ont été construites dans notre atelier nous permettant de récolter l'urine de 24h. de 5-6 souris par cage. Le schéma de chaque cage est donné par la fig. III.4.

Volume urinaire journalier : dans les conditions choisies, on recueille en moyenne 0,8 ± 0,3 ml/animal/24h. (calculées sur 25 prélèvements).

2.1.2. Résultats obtenus par l'analyse d'extraits urinaire

mâle et femelle de souris (fractions 2 et 3) sur trois colonnes chromatographiques (OV-1, OV-17 et OV-225)

Conditions de l'analyse chromatographique

Nous avons utilisé les conditions de séparation décrites au chapitre I (page 64) avec les modifications suivantes :

colonne OV-17 : La séparation de la fraction F 3 a été effectuée à la température de colonne de 232°C

colonne OV-225: La séparation des fractions F 2 et F 3 a été effectuée à la température de colonne de 234°C.

Les autres résultats d'analyses restent inchangées.

Résultats :

1° Fraction F 2.-

Les chromatogrammes des fig. III.5, III.6 et III.7, nous montrent les profils de la fraction F 2 de la colonne d'alumine de deux extraits urinaires mâles et femelles obtenus sur trois phases de polarités différentes (OV -1, OV-17 et OV-225).

En examinant rapidement les chromatogrammes, on constate :

1) Chez les mâles, la fraction F_2 ne contient pratiquement pas de pics. Tous les pics observés sont des pics parasites dûs à des impuretés (hélicase, solvants, etc.). Ces mêmes pics sont retrouvés en effet dans le chromatogramme d'un blanc formé de l'eau et de l'hélicase et qui a été analysé en même temps que les échantillons urinaires.

2) Chez les femelles, la fraction F_2 contient quelques pics qui sont retrouvés dans la fraction F_3.

Nous pensons qu'il doit s'agir des mêmes substances de la fraction F 3 qui ont été éluées en partie dans la fraction F 2 de la colonne d'alumine.

2° Fraction F 3.-

Cette fraction montre sur les 3 colonnes chromatographiques choisies la présence de plusieurs pics dont certains sont

formés du mélange de substances mal ou non séparées (par ex. pic E sur OV-1. Les substances en question sont apparemment de nature polaire: les 11-oxo-17-oxo-stéroïdes, le pregnandiol et le pregnantriol urinaire de l'homme sont élués dans cette fraction.

Les chromatogrammes caractéristiques de la fraction 3 sont donnés dans les fig. III.8, III.9, III.10. Cette image sera commentée plus loin après avoir préalablement procédé à une tentative d'identification des pics en question.

2.2. Tentative d'identification des stéroïdes par application du critère du nombre stéroïdique (N.S.) sur les trois colonnes.

Nous avons essayé d'identifier les différents pics obtenus dans la fraction F 3 de l'extrait urinaire de souris en comparant le nombre stéroïdique de chaque pic par rapport aux valeurs préalablement établies par le screening de stéroïdes de référence (voir tableaux I.14 et I.15).

Nous avons considéré un pic comme "identifié" lorsque son nombre stéroïdique correspond à celui du stéroïde de référence (avec une erreur de $\pm$ 0,10 pour la colonne OV-1 et $\pm$ 0,20 pour les deux autres) dans les trois colonnes.

Le tableau III.4 nous montre les résultats obtenus :

Stéroïdes identifiés	Nombre stéroïdique (référence)			Pics	Nombre stéroïdique (souris)		
	OV-1	OV-17	OV-225		OV-1	OV-17	OV-225
11-oxo-androstérone	24.50	26.30	30.25	B	24.30	26.35	30.05
11-oxo-androstérone	24.50	26.30	30.25	C	24.55	26.35	30.05
testostérone	25.60	26.90	30.50	D	25.55	26.95	30.60
pregnanolone	25.60	26.80	29.00	D	25.55	26.95	28.95
5a-androst-2-ene-11β-01-17-one	23.05	25.60	30.25	A	23.00	25.40	30.05

Tableau III.4 : Les pics arbitrairement désignés par des lettres sont ceux de la colonne OV-1.

On constate que de tous les pics qui figurent sur les chromatogrammes des trois colonnes, seuls quatre ont été "identifiés".

1) Le pic A peut correspondre au 5α-androst-2-ene-11Ol-17-one

2) Le pic B peut correspondre au 11-oxo-androstérone

3) Le pic C peut également correspondre au 11-oxo-androstérone

4) Le pic D peut correspondre, soit à la testostérone, soit à la pregnanolone.

Les autres pics n'ont pas pu être identifiés étant donné que leurs nombres stéroïdiques ne correspondaient pas aux valeurs des références qui étaient à notre disposition, ceci dans les trois colonnes.

Cependant, il est très important de noter que nous n'avons pas réussi à identifier des métabolites connus de l'urine humaine, tels que parmi les $C_{19}O_2$, l'androstérone, l'étiocholanolone et la DHA, et parmi les $C_{19}O_3$ la 11-oxo-étiocholanolone, la 11β-OH-androstérone et la 11β-OH-étiocholanolone (exception faite de la 11-oxo-androstérone qui pourrait correspondre aux pics B ou C). Par ailleurs, nous n'avons pas trouvé de pregnandiol et de pregnantriol.

2.3. Etude sur les variations physiologiques et physiopathologiques des substances stéroïdiques ou non stéroïdiques mesurées par la méthode choisie.

Afin de pouvoir éventuellement s'assurer de l'identité exacte des pics principaux trouvés sur les chromatogrammes de la fraction F 3, nous avons pensé qu'il pourrait être intéressant d'appliquer la méthode à des urines d'animaux présentant nécessairement des différentes physiologiques ou physiopathologiques.

Ces études biologiques, qui sont donc complémentaires de nos études physico-chimiques, ont porté sur les diverses situations suivantes :

3.1. Différence sexuelle :

La superposition des chromatogrammes des mâles et des femelles normales révèle l'existence d'une différence à la

fois qualitative et quantitative entre les deux sexes (fig. III.11).

En examinant le chromatogramme des femelles par rapport au chromatogramme des mâles, nous faisons la constatation suivante : la différence qualitative tient à la présence de trois pics H, I et J qui n'existent pas chez les mâles.

Les différences quantitatives ont été calculées selon la méthode suivante :

Nous avons quantifié les différents pics par une méthode de calcul arbitraire. Comme nous ne connaissons pas encore avec certitude la nature exacte de ces pics, la quantification par rapport à une référence n'était pas possible.

De ce fait, nous avons employé une méthode qui consiste à calculer un rapport de surfaces entre chaque pic et un standard externe choisi également arbitrairement.

Le standard est injecté 3-4 fois pendant la journée des analyses. La surface moyenne est calculée par la relation : hauteur x largeur à mi-hauteur, puis ramenée à 1µl.

La surface de chaque pic est calculée et ramenée à 1 µl de solution injectée de la même façon que le standard.

Le rapport surface du pic/surface standard est calculé puis exprimé par rapport à 100 ml d'urine.

Comme standard, nous avons choisi le 11β-OH-androstérone à une concentration de 0,25 µg/µl de BSTFA.

Les raisons qui nous ont poussés à adopter cette méthode de calcul sont les suivantes :

1. Le calcul d'un tel rapport permet en effet d'éliminer toute variation dans la réponse du détecteur du chromatographe. Si pour une raison ou une autre, le détecteur répond différemment d'une série d'analyses à une autre, cette variation serait dans le même ordre de grandeur pour le standard.

2. La connaissance de ce rapport devrait nous permettre ultérieurement de quantifier exactement nos pics, ceci à condition que ces derniers soient identifiés de façon

certaine. Il suffit dès lors de calculer le rapport du stéroïde de référence du pic identifié par rapport au 11β-OH-androstérone, de faire la courbe étalon et de tirer de cette dernière valeur réelle du pic de l'extrait analysé.

Les résultats de ces calculs sont donnés dans le tableau général (III.5) d'où il ressort que les pics communs B,C,D, E,F sont chez les femelles quantitativement inférieurs à ceux des mâles dans des proportions de l'ordre de 15 à 40%. Seul le pic G est supérieur de 20% à celui des mâles. Si l'on additionne toutes les surfaces des pics en question et que l'on ramène celui des mâles à 100, on note chez les femelles une diminution de l'ordre de 10% du total des "stéroïdes" détectés (fig. III.12). On notera d'emblée que les substances mises en évidence, dérivant probablement toutes du métabolisme de l'androstane et du pregnane, sont légèrement inférieures chez les femelles par rapport aux mâles.

Nous reparlerons de cette question dans la discussion générale.

2.3.2. Rôle de l'âge

Etant donné que chez tous les mammifères l'apparition des caractères sexuels secondaires traduit une évolution spécifique du système endocrinien et plus particulièrement de la maturation des gonades, il nous a paru important de faire un certain nombre de dosages des "17-oxo-stéroïdes" selon la méthode choisie en fonction de l'âge.

Les résultats obtenus ont été condensés dans le tableau (III.5) et la figure (III.13).

Les valeurs ont été obtenues à partir d'un pool d'urine de 100 ml provenant d'une vingtaine de souris placées en cages métaboliques durant le temps nécessaire à l'obtention du volume précité.

Les valeurs indiquées ont été quantifiées selon la méthode décrite dans le paragraphe précédent.

Sexe		(Femelles), R_3					(Mâles), R_3					
		Rapport de surface/surface 11βOH-androstérone										
Age (mois)		(2-4)	(5-8)	(8-10)	(11-13)	(moyenne)	(4-6)	(6-7)	(8-9)	(11-12)	(13-14)	(moyenne)
Nom	N.S											
A	23.00	57.1	62.8	65.7	52.8	59.6	78.9	29.4	31.2	68.3	89.5	59.5
B	24.30	89.6	49.0	121.0	139.2	99.7	199.7	116.2	124.8	140.2	173.6	150.9
C	24.55	285.6	219.2	210.5	321.4	259.7	261.5	125.2	241.8	234.7	675,6	307.8
D	25.55	43.5	86.8	30.1	32.0	48.1	54.6	51.2	109.4	111.1	73.5	80.0
E	26.20	193.0	44.4	199.6	150.8	147.0	239.3	104.2	149.2	196.4	312.3	200.3
F	26.70	438.0	575.4	372.6	359.0	436.3	311.2	451.7	547.8	743.8	998.5	610.6
G	27.00	451.2	192.0	125.9	292.8	265.5	90.0	23.3	142.6	304.3	554.2	222.9
H	27.65	N . Q	60.4	55.2	35.8	37.9	-----	-----	-----	-----	-----	-----
I	28.10	59.0	91.4	119.2	54.2	81.0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
J	28.75	99.0	60.4	N . Q	38.4	49.4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Total		1716.0	1441.8	1299.8	1476.4	1483.7	1235.2	901.2	1346.8	1798.8	2877.2	1632.0
Total en %		100.0	84.0	75.7	86.0		100.0	73.0	109.0	145.6	232.9	

Tableau III.5 : Variation du rapport des surfaces des pics, séparés sur colonne OV-1 de souris mâles et femelles en fonction de l'âge.
N.S = nombre stéroïdique

On observe pour chacun des pics caractéristiques du chromatogramme une évolution variable selon le pic considéré.

L'examen des courbes individuelles montre que celles-ci évoluent sensiblement comme la somme de toutes les substances détectées. Chez les femelles, celles-ci diminuent à partir du troisième mois jusqu'au neuvième et dixième mois pour remonter ensuite légèrement sans retrouver pour autant sa valeur initiale (3e mois).

Chez les mâles, l'évolution des 17-oxo-stéroïdes totaux évolue à peu près comme chez les femelles entre le 3e et le 6e mois; dès le 7e mois, il y a une forte augmentation de l'élimination urinaire des substances en question qui atteint plus de deux fois la valeur initiale entre le 13e et le 14e mois.

Il parait évident qu'il existe une grande différence quantitative sexuelle entre les mâles et les femelles en fonction de l'âge si l'on prend en considération les produits séparés par la chromatographie en phase gazeuse selon notre méthode.

3.3. Effet de surcharge en stéroïdes

Dans ce paragraphe, nous examinerons l'effet de surcharge en testostérone, en progestérone d'une part, et en anti-conceptionnel d'autre part.

1. Surcharge en testostérone et en progestérone

Compte tenu des buts premiers poursuivis tout le long de nos travaux, c'est-à-dire l'analyse des 17-oxo-stéroïdes, nous avons choisi d'étudier tout d'abord les effets de surcharge en testostérone et en progestérone sur des individus normaux.

Méthodologiquement, nous avons procédé de la façon suivante pour chacun des produits précités :

Un lot de 40 animaux mâles ou femelles reçoivent deux injections hebdomadaire de 25 µg/animal de testostérone ou de progestérone (Perandren-Ciba et Progestérone-Vifor) en

injection huileuse (0,05 ml) par voie sous-cutanée.

La moitié du lot est placée en cages métaboliques immédiatement après la fin de l'injection pour une durée de 24h. Cette première série de 20 animaux est retirée et l'on place alors la deuxième série de 20 animaux injectés le jour précédent également pour 24 h.

L'ensemble des opérations est répété deux fois par semaine.

Les fig. (III.14 et III.15) mettent bien en évidence les modifications que l'administration de testostérone ou de progestérone peuvent apporter aux chromatogrammes des mâles normaux ou des femelles normales.

On constate donc d'entrée de cause que ces stéroïdes à forte activité biologique entraînent des répercussions importantes dans l'aspect des courbes, augmentant la surface de certains pics ou diminuant jusqu'à faire disparaître complètement certains autres.

En appliquant à ces courbes la méthode d'estimation quantitative, puis en calculant leurs valeurs en pourcent par rapport aux mâles ou femelles normales, on obtient le diagramme (fig. III.16)

Ce diagramme confirme bien le fait que la progestérone administrée aux femelles augmente assez fortement les pics A.B.C, H et I; ces deux derniers pics n'étant d'ailleurs pas présents chez les mâles. Par contre, la progestérone réduit ou annule les pics D,E,F,G et J.

Chez les mâles, la progestérone augmente aussi les pics A et C, alors qu'elle diminue assez fortement ou annule tous les autres.

Concernant les effets de la testostérone, on constate que celle-ci entraîne chez les femelles pratiquement sur tous les pics une sensible diminution ou une annulation des pics caractéristiques de ce sexe, à l'exception du pic C qui pourrait être légèrement augmenté.

Chez les mâles, la testostérone laisse inchangé le pic A, mais augmente les pics C et G par rapport aux animaux normaux, alors qu'elle diminue fortement ou annule les autres pics caractéristiques.

2. Surcharge en anticonceptionnel

Un lot de 40 animaux femelles reçoivent quotidiennement une injection huileuse de 5 µg de lynestrenol et 0,5 µg de mestranol par animal (voie sous-cutanée).

La moitié du lot est placé en cages métaboliques 15 jours après le début des injections, pour une durée de 24 heures.

Le lendemain, la seconde moitié des animaux remplace la première dans les cages pour la même durée.

Cette rotation est poursuivie en même temps que les injections pendant toute la durée nécessaire au recueillement du volume urinaire (env. 150 ml). Les produits injectés ont été préparés à partir de l'Anacycline 101 (Ciba) par pulvérisation de chaque dragée (1 mg de lynestrenol et 0,1 mg de mestranol) dans un mortier. Le pulvérisat est repris dans un tube à essai avec 2 fois 2 ml d'eau distillée. Cette dernière est extraite 4 fois avec 5 ml d'éther. Les volumes d'éther sont réunis et réduits jusqu'à environ 2 ml. Ces derniers sont alors introduits dans un volume donné d'huile d'olive stérile qu'on garde à 60°C jusqu'à évaporation totale de l'éther. La solution huileuse est stérilisée par tyndalisation et conservée en flacon scellé.

L'analyse chromatographique, selon la méthode choisie, révèle un profil particulier comme on peut le coir dans la fig. (III.17).

On constate une disparition totale de tous les pics, à l'exception des pics A,C et G. Ces deux derniers étant augmentés de 68% et 96%, alors que le premier est diminué de 54% par rapport aux pics normaux.

2.3.4. Cycle oestral

Grâce aux travaux poursuivis dans notre laboratoire par Mlle A. Trolliet sur le diagnostic cytologique des diverses phases du cycle oestral (technique des frottis vaginaux), il a été possible d'obtenir les urines de souris femelles se trouvant en période pré-ovulatoire et en période post-ovulatoire.

Pratiquement, les femelles choisies pour cette expérience sont tout d'abord dégroupées et placées dans des cages comportant deux compartiments, l'un dans lequel on met une ou deux femelles et l'autre dans lequel on place un mâle (méthode de Whitten pour la régularisation du cycle oestral; dans ces conditions, les cycles sont synchronisés et ont une durée de 4-5 jours).

Durant cette phase préparatoire, on contrôle les frottis vaginaux et les femelles qui présentent les caractéristiques cytologiques de la phase pré-ovulatoire (on écarte tous les cas d'oestrus) sont placées dans les cages métaboliques pour une durée de 24 heures. Par ailleurs, les animaux qui présentent des frottis du type metoestrus 1 jusqu'à dioestrus précoce sont également séparés et placés dans les cages métaboliques.

Tous les animaux utilisés dans cette expérimentation sont âgés de 4-6 mois. L'analyse des urines recueillies nous a permis d'obtenir les courbes de la fig. (III.19).

Les variations en % de chaque pic du chromatogramme par rapport à celui des femelles "normales", c'est-à-dire sans contrôle du cycle oestral, mettent en évidence une très nette augmentation durant la phase post-ovulatoire des pics A,B,D et H,I et simultanément des diminutions des pics D,F,G et une disparition de J, alors que dans la phase pré-ovulatoire il y a diminution des pics C,D,E,F,G et H, et également disparition du pic J. (fig. III.20)

2.3.5. Urine d'animaux porteurs de tumeurs greffées

Il nous a paru intéressant de prélever également des urines d'animaux porteurs de tumeurs greffées. En l'occurrence, il s'agit d'une tumeur maligne épithéliale d'origine

mammaire, entretenue dans notre laboratoire par transplantation à intervalle régulier sur des animaux en bonne santé (Tumeur de Caspari).

Il est bien établi que les animaux porteurs de tumeurs présentent très généralement des altérations morphologiques et biochimiques de la surrénale : ces altérations pourraient être rapportées à un état de stress chronique ou aussi être consécutives à la sécrétion par le tissu tumoral de substances spécifiques agissant à distance sur d'autres organes, comme par exemple la toxohormone (140).

Le profil du chromatogramme des femelles porteuses de tumeurs de Caspari est donné dans la fig. (III.17). Du point de vue quantitatif, on observe une disparition des pics B,H,I et J, une réduction des pics F et G et une augmentation des pics A,C,D et E. (fig. III.21).

D I S C U S S I O N :

L'examen des résultats de l'expérimentation biologique nous montre que le traitement des animaux par des surcharges hormonales entraine des modifications nettes sur le "profil stéroïdique" de l'extrait urinaire comparativement aux animaux non traités.

Avant d'examiner ces modifications avec plus de détail rappelons qu'il existe une différence sexuelle marquée par des différences qualitatives et quantitatives entre les diverses substances trouvées dans l'urine.

Parmi tous les pics de substances qui présentent des valeurs de surface diminuées chez les femelles par rapport aux mâles, seul le pic D (qui pourrait être la testostérone ou la pregnanolone selon le critère du nombre stéroïdique) a une valeur nettement inférieure chez les femelles par rapport aux mâles (40%).

Cette différence sexuelle est aussi mise en évidence par les courbes de l'élimination urinaire des substances "non identifiées" en fonction de l'âge (fig. III.13). On observe en effet une évolution plus ou moins parallèle entre les deux sexes du 3-5ème mois et jusqu'au 7ème mois. A partir de cet âge, on assiste à une forte augmentation de l'élimination urinaire des substances en question chez les mâles par rapport aux femelles.

Si l'on compare maintenant ces courbes avec celles des 17-oxo-stéroïdes chez l'homme, on constate qu'elles évoluent de manière totalement différente l'une de l'autre (fig. III.3 et III.13). Chez l'homme, l'élimination des 17-oxo-stéroïdes est maximale entre 25-30 ans (138)(137), tandis que chez la souris, l'élimination des stéroïdes, qui sont sensés être représentés dans les pics de nos chromatogramm est minimale entre 5 et 6 mois. On ne saurait en l'état actuel de nos travaux trouver une interprétation valable de cette observation.

Les différentes surcharges hormonales faites à la souris, par voie sous-cutanée, nous montre des perturbations évidentes des pics séparés par chromatographie gazeuse. On observe dans certains cas une disparition totale de certains d'entre eux qui sont normalement présents dans l'extrait urinaire de souris non traitées.

La description de ces variations qualitatives et quantitatives a été faite au paragraphe 2.3.3. (. 98-101). Nous nous limiterons donc ici à comparer les différents profils obtenus à la suite de ces surcharges.

La comparaison des effets de surcharge à la testostérone et à la progestérone (fig. III.14, III.15 et III.16) montre que les deux hormones modifient qualitativement et quantitativement les chromatogrammes aussi bien chez les souris mâles que chez les souris femelles. Dans certains cas, ces modifications sont parallèles (effets associés). Par exemple, le pic C est augmenté dans les deux cas de surcharge chez les deux sexes.

On note également des fluctuations bien marquées et plus ou moins parallèles de l'ensemble des pics D, E, F, G et J qui se manifestent soit par une diminution, soit par une disparition totale des pics considérés (le pic G des souris mâles traitées à la testostérone fait exception puisque sa valeur est augmentée de 36% par rapport à l'animal normal). Dans d'autres cas, les modifications des pics dépendent, en quelque sorte, de l'hormone injectée (effets dissociés). Par exemple, la progestérone administrée augmente l'élimination urinaire du pic A chez les mâles et chez les femelles. Elle augmente aussi le pic B légèrement chez les femelles seules et le pic G chez les mâles. Les deux pics H et I sont également augmentés d'environ 120% chez les femelles. La testostérone, par contre, ne modifie pas le pic A chez les mâles, mais diminue de 66% le même pic chez les femelles et fait disparaître le pic B chez les mâles tout en le diminuant de 84% chez les femelles. On note également une diminution des pics H et I de 40 et 47% chez les femelles avec l'administration de cette hormone.

La comparaison des effets de surcharge des souris femelles qui ont reçu l'anacycline et les souris femelles qui ont reçu de la progestérone seule nous montre la présence d'une ressemblance assez intéressante dans le comportement de quelques pics (fig. III.22). En effet, on note une diminution ou une disparition des pics D, E, F et J d'une part, et une augmentation du pic C dans les deux situations, d'autre part. Ceci laisse supposer qu'il existe très probablement une relation (directe ou indirecte) avec les gestagènes administrés dans les deux cas (lynestrol et progestérone).

Nous avons déjà noté que l'élimination urinaire des substances révélées par chromatographie gazeuse chez les souris femelles ne donne pas de différence qualitative des pics séparés mais, par contre, des différences quantitatives lorsque l'urine est recueillie dans la phase pré-ovulatoire ou dans la phase post-ovulatoire.

Si l'on compare plus précisément les diagrammes de ces deux phases du cycle oestral et spécialement le diagramme de la phase post-ovulatoire avec celui des animaux surchargés à la progestérone, on constate que les pics A, C, H et I augmentent de valeur dans le même ordre de grandeur dans la phase post-ovulatoire que dans le cas des animaux traités à la progestérone (fig. III.23).

Si l'on admet que l'élimination urinaire durant le cycle oestral de la souris est conditionné d'une manière identique à celle de la femme, on peut penser que les pics en question sont en relation étroite avec la sécrétion et le métabolisme de la progestérone.

En conclusion, des variations physiologiques et physiopathologiques des substances stéroïdiques ou non stéroïdiques de l'extrait urinaire de souris apparaissent en fonction du sexe, de l'âge des animaux, de surcharges hormonales et de l'évolution du cycle oestral.

Il semble exister une certaine ressemblance dans le comportement de certains pics dans le cas des animaux traités à la progestérone seule et dans le cas où les animaux se trouvent au stade post-ovulatoire de leur cycle oestral. Enfin, il y a également quelques indices d'un effet gestagène de l'anacycline.

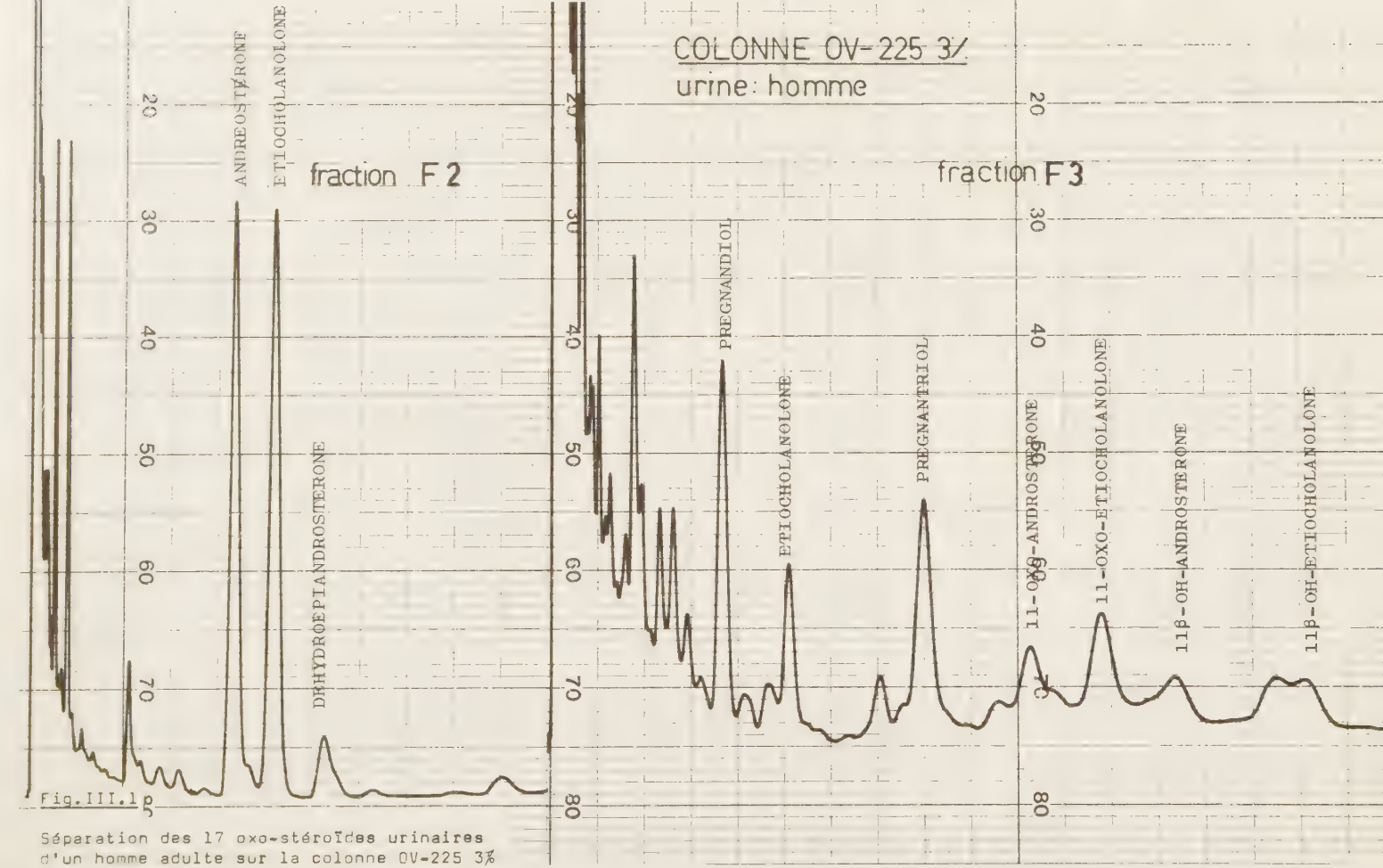


Fig. III.1 β

Séparation des 17 oxo-stéroïdes urinaires d'un homme adulte sur la colonne OV-225 3% après extraction par l'amberlite. Fraction F_2 et F_3 de la colonne d'alumine. "To de la colonne: 225°C, gaz porteur: 1,0 kg/cm^2,

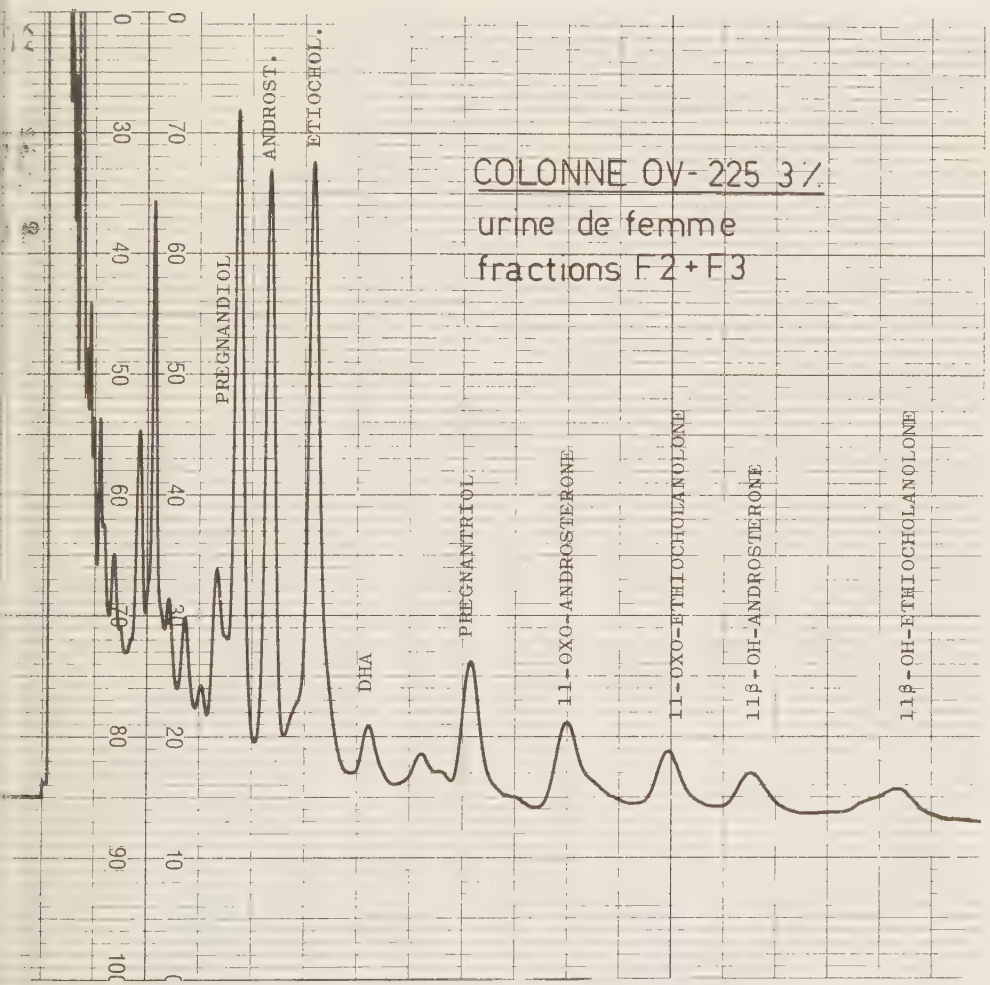


Fig.III.2

Séparation des 17 oxo-stéroïdes urinaires d'une femme adulte sur la colonne OV-225 3% après extraction par l'amberlite. Fraction F_2 et F_3 de la colonne d'alumine "T°de la colonne:225°C, gaz porteur:1,0 kg/cm^2, H_2/air :1,0/1,3 , atténuation: 10 x 16 , dérivés TMSI" .

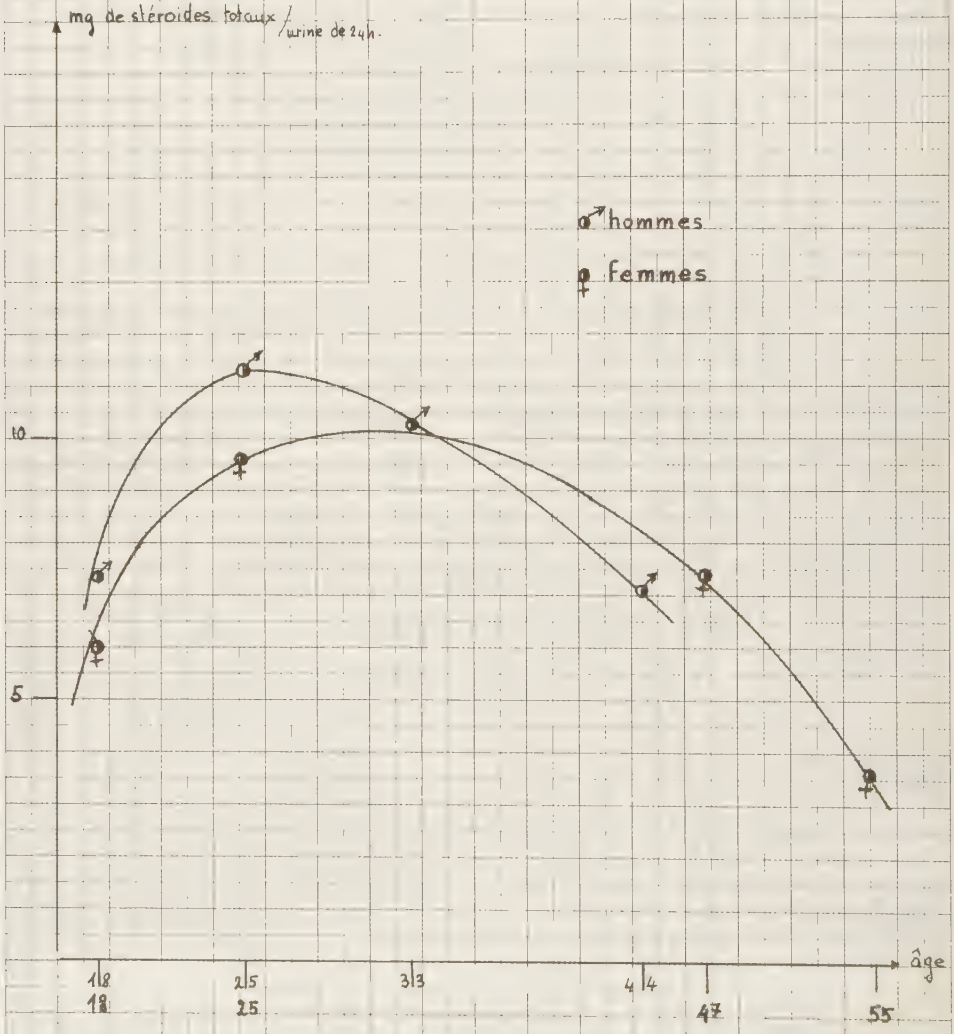
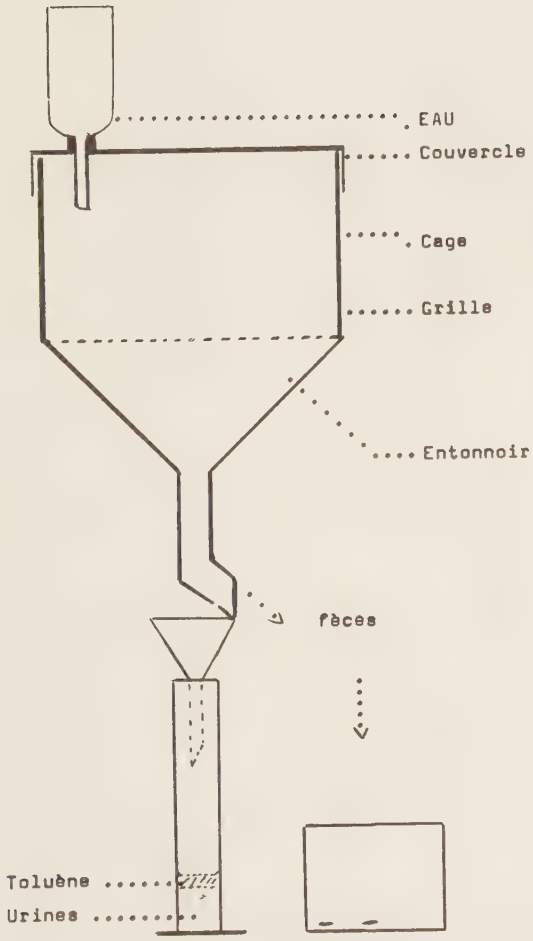


Fig. III.3

Evolution des 17-oxo-stéroïdes totaux en fonction de l'âge, chez l'homme et chez la femme.



SCHEMA D'UNE CAGE METABOLIQUE

Fig.III.4

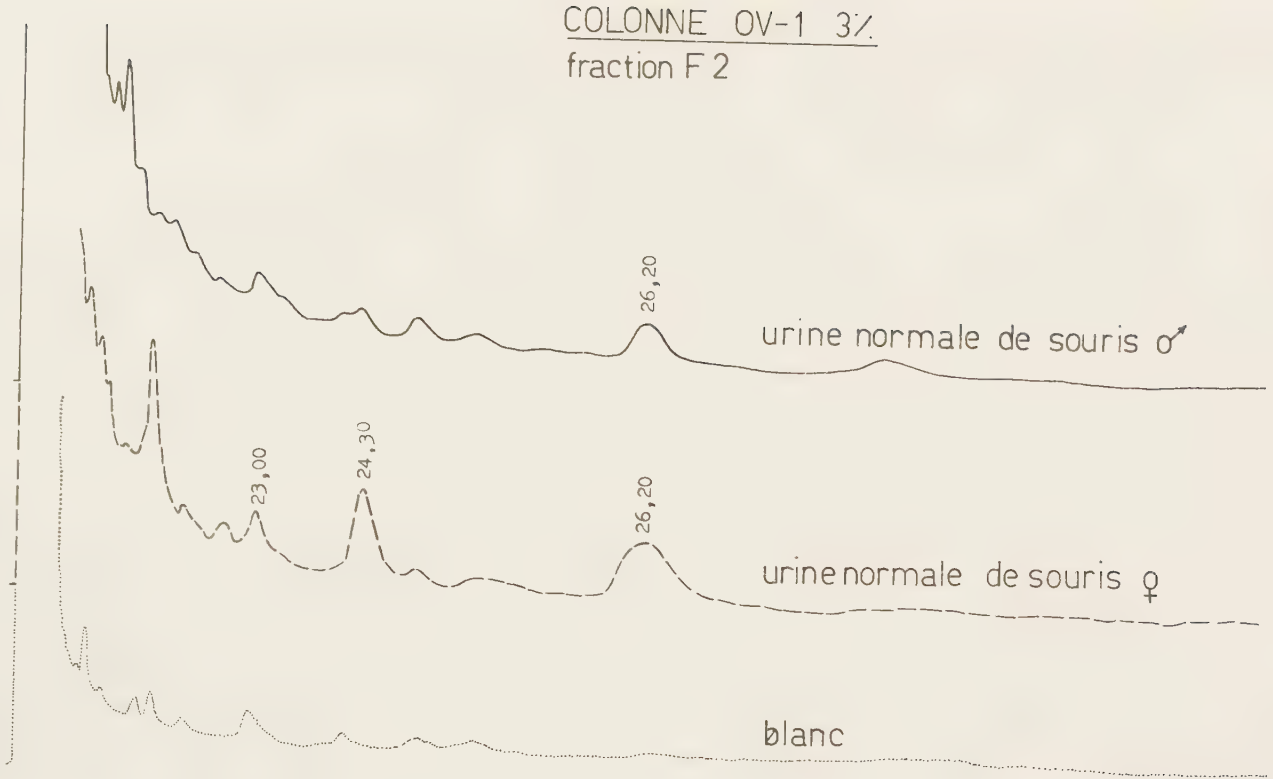


Fig.III.5

Chromatogrammes de la fraction F_2 d'une urine de souris ♂ et ♀ obtenus avec la colonne OV-1 3% .

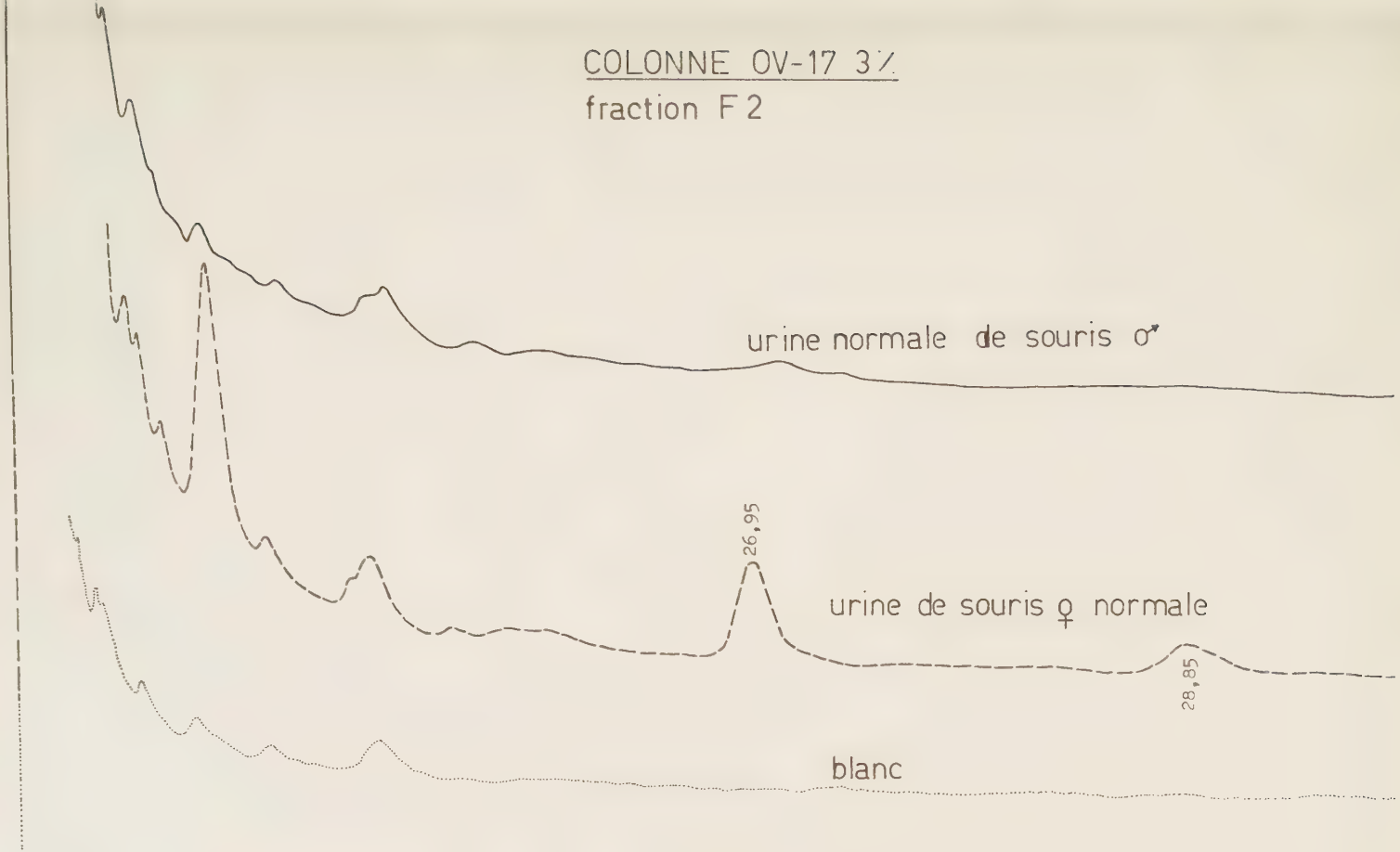


Fig.III.6

Chromatogrammes de la fraction F_2 d'une urine de souris ♂ et ♀ obtenus avec la colonne OV-17 3% .

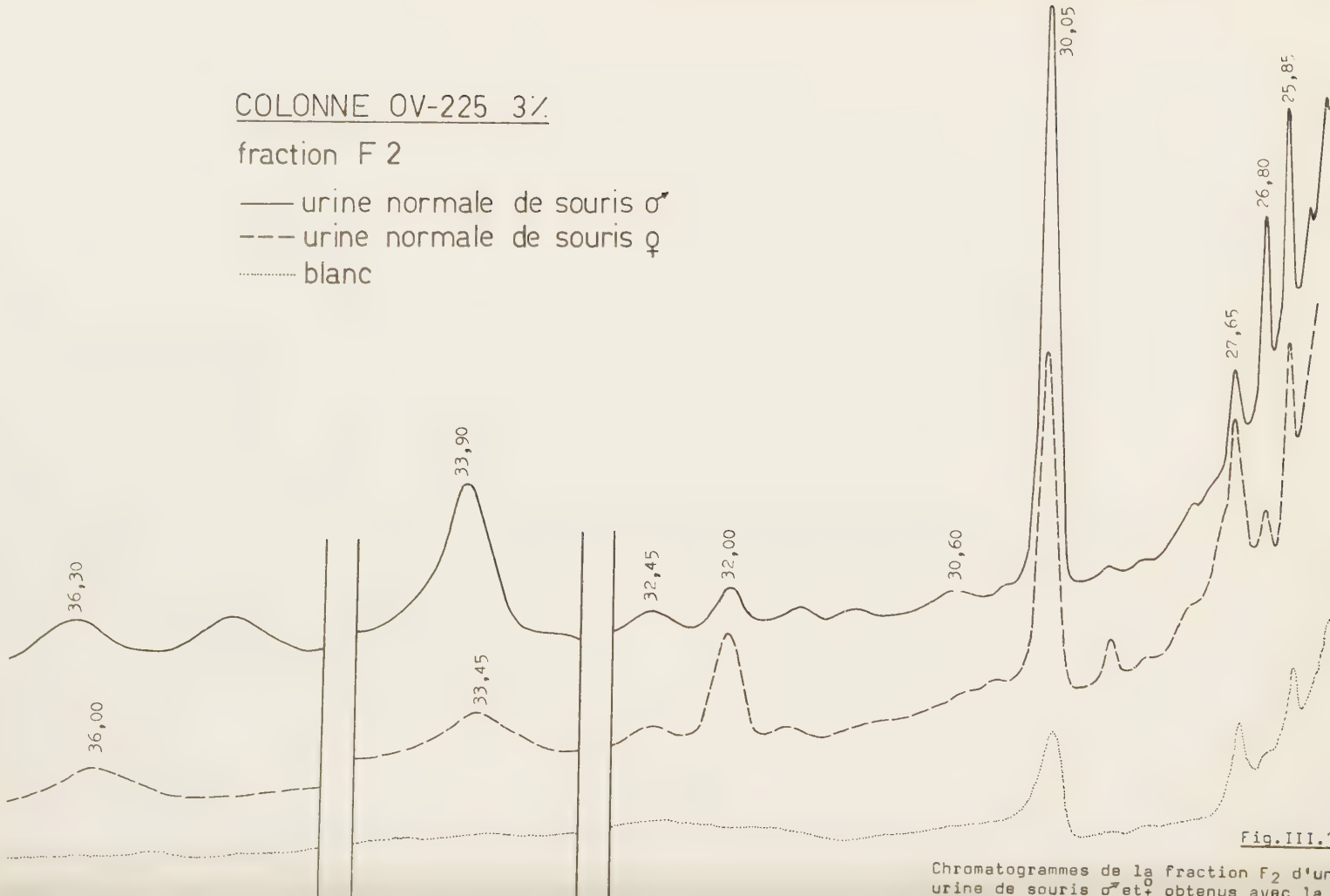


Fig.III.

Chromatogrammes de la fraction F_2 d'ur
urine de souris ♂ et ♀ obtenus avec la

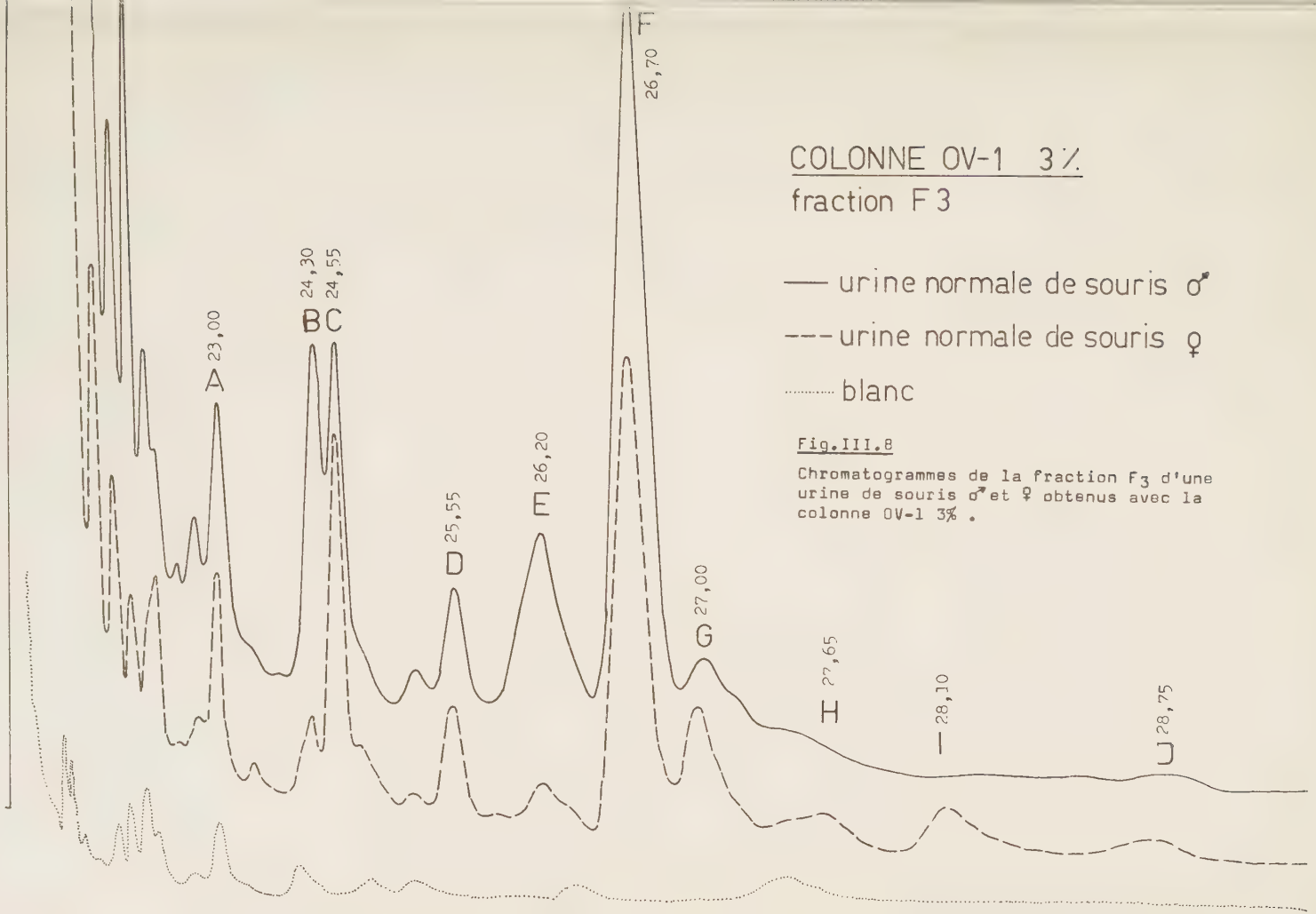


Fig.III.8

Chromatogrammes de la fraction F_3 d'une urine de souris ♂ et ♀ obtenus avec la colonne OV-1 3% .

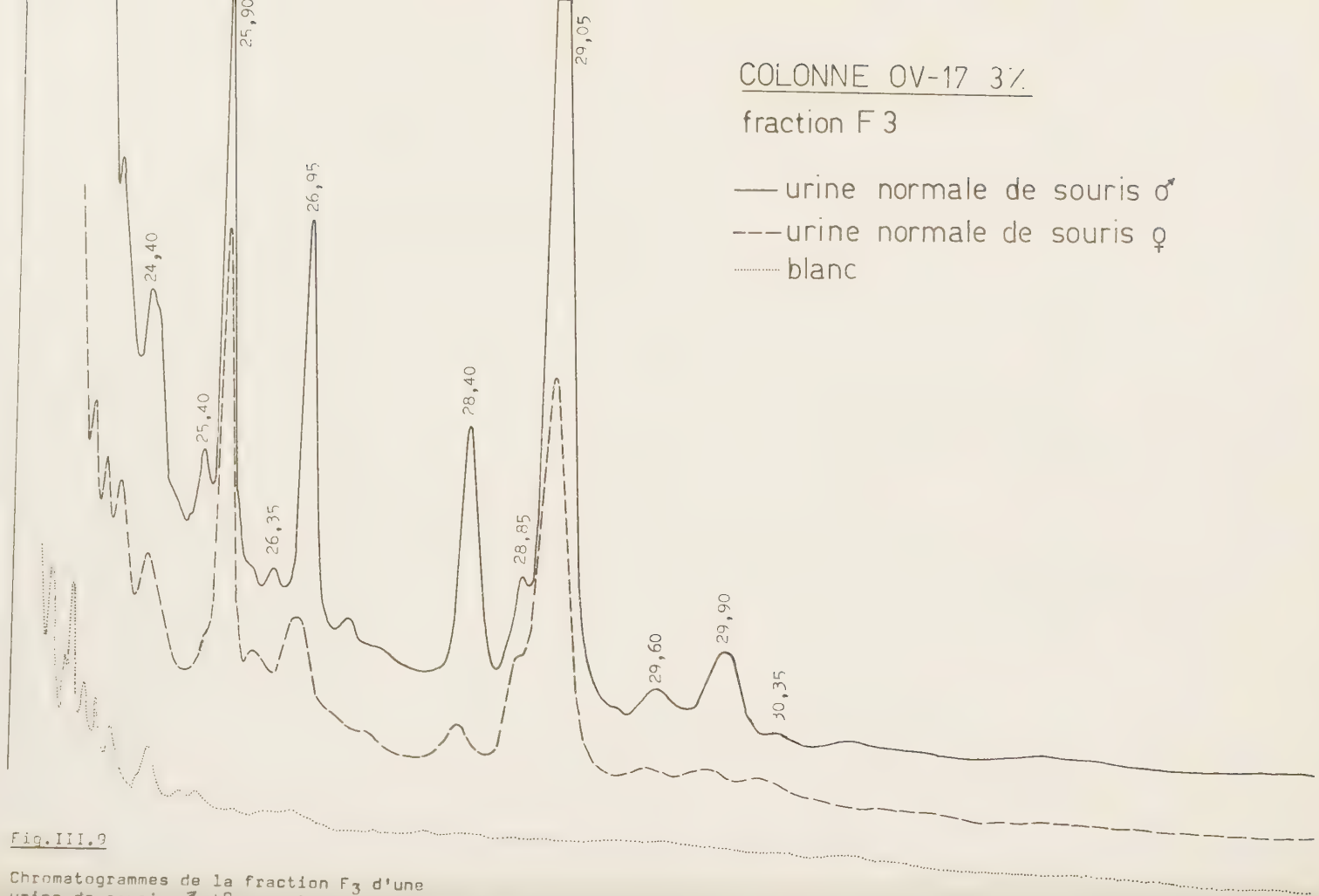


Fig.III.9

Chromatogrammes de la fraction F_3 d'une urine de souris ♂ et ♀ avec la colonne

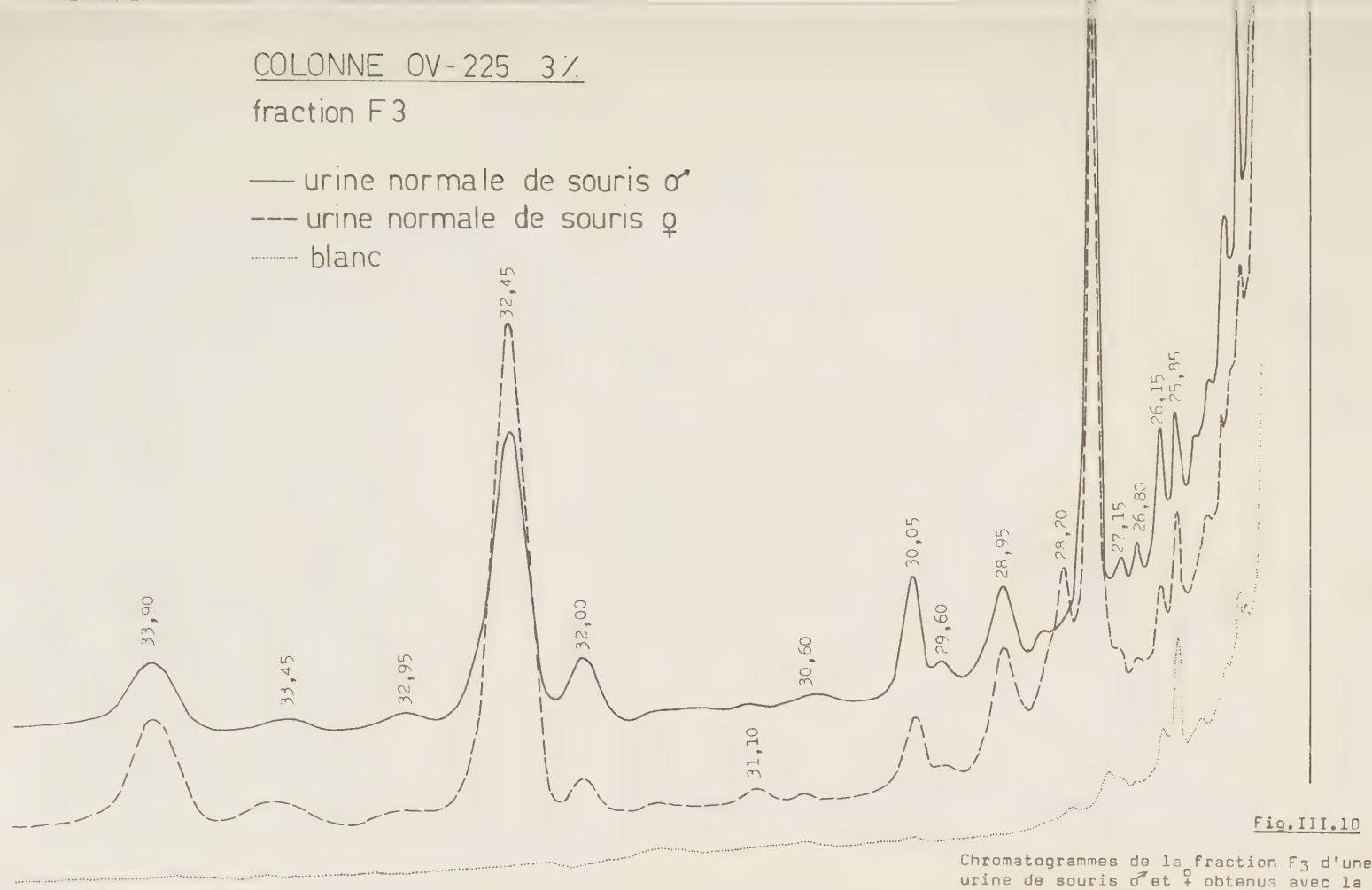


Fig.III.10

Chromatogrammes de la fraction F3 d'une urine de souris ♂ et ♀ obtenus avec la colonne OV-225 3% .

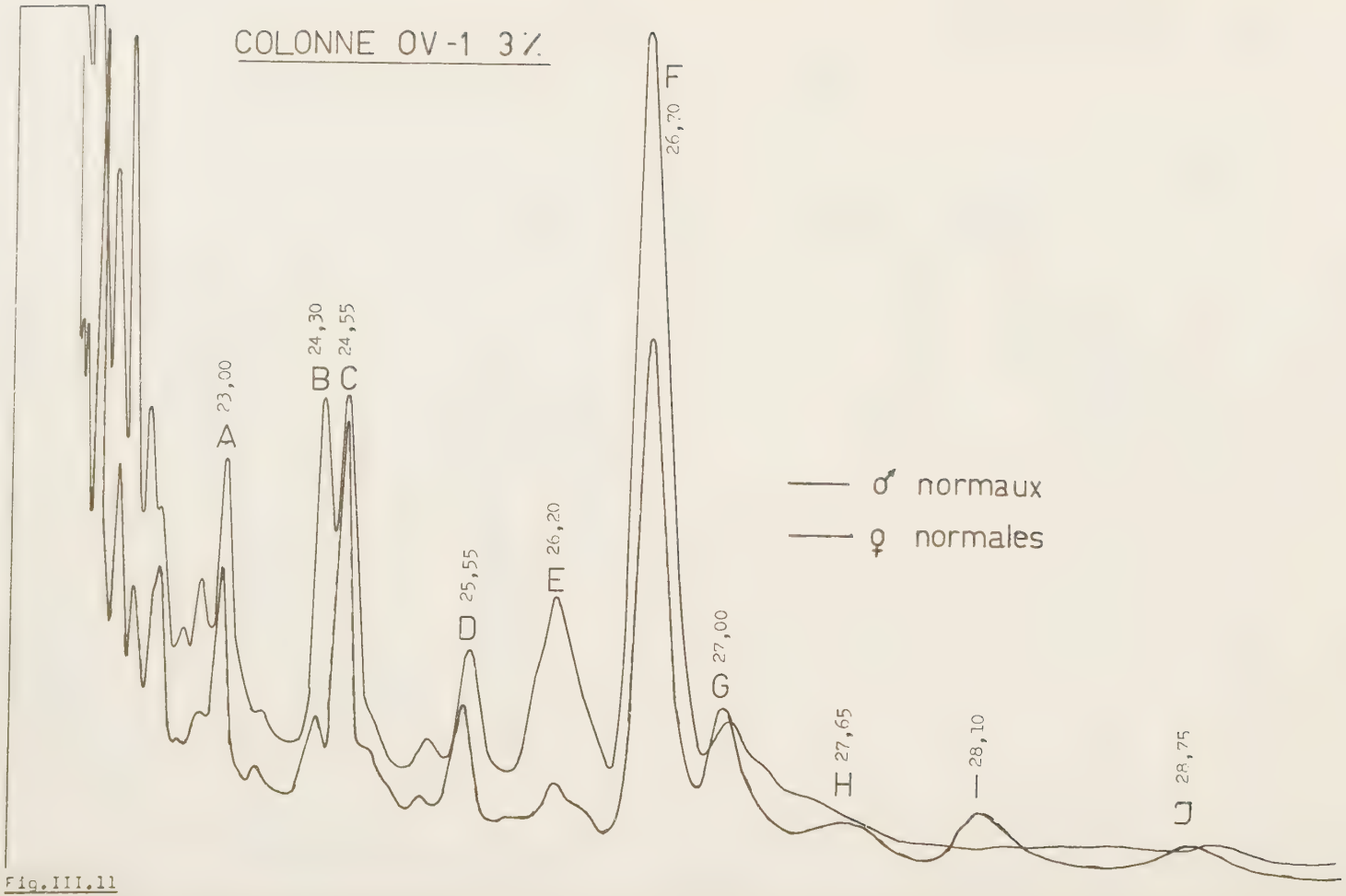
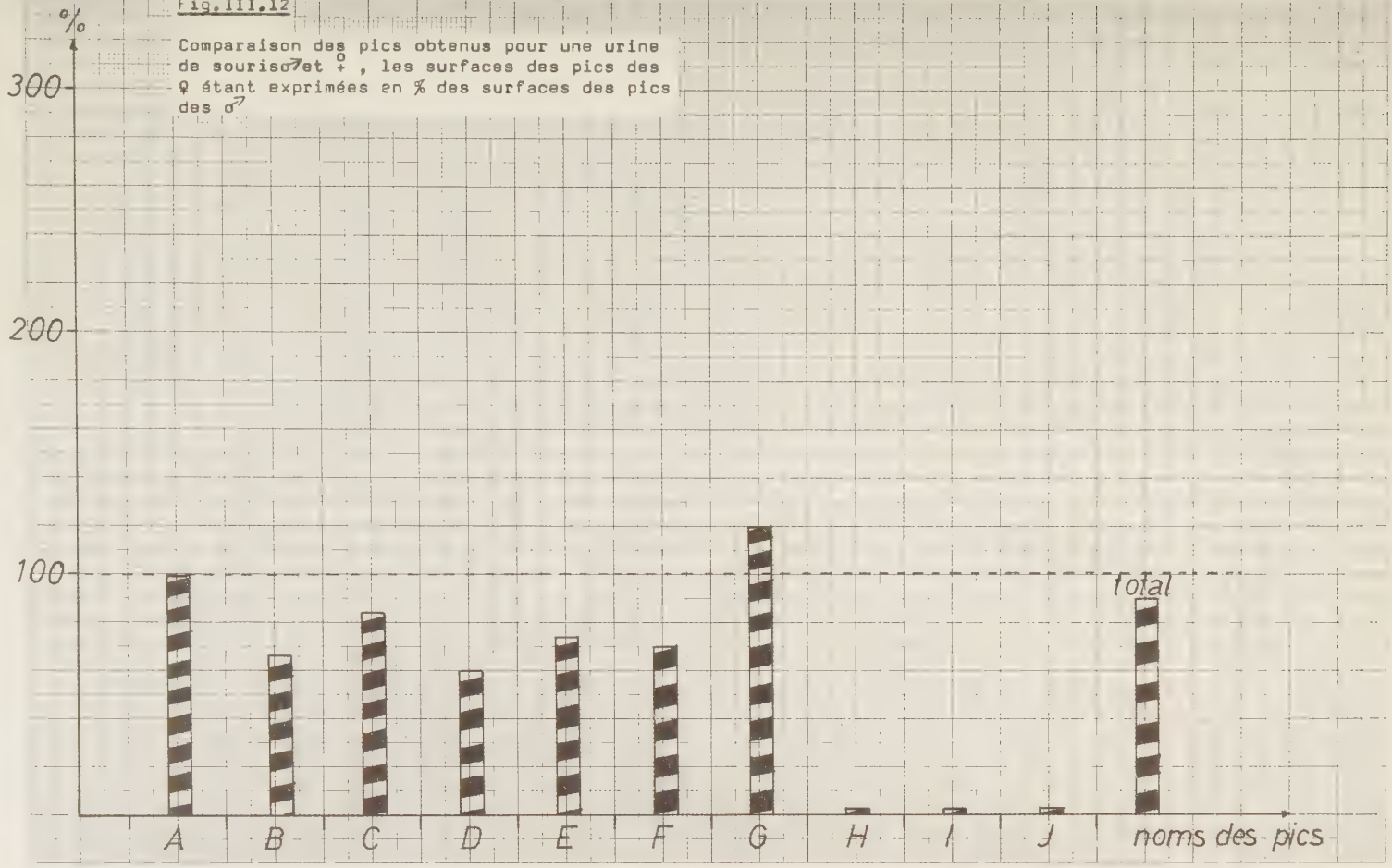


Fig.III.11

Comparaison de chromatogrammes types d'un

Fig. III.12

Comparaison des pics obtenus pour une urine de souris ♂ et ♀, les surfaces des pics des ♀ étant exprimées en % des surfaces des pics des ♂



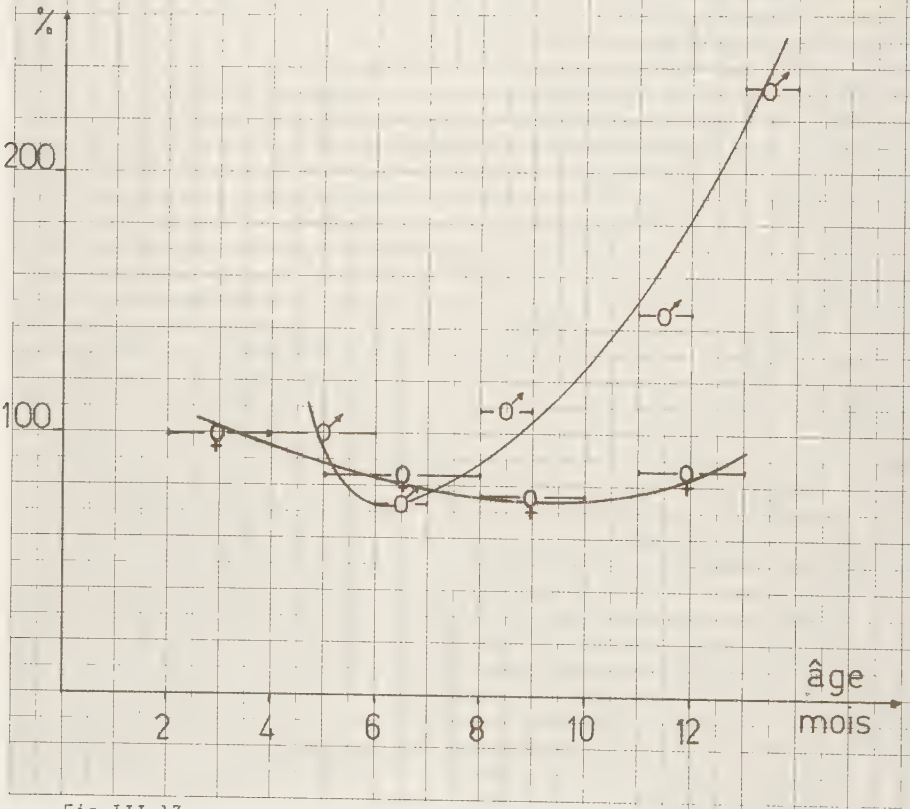


Fig.III.13

Evolution en fonction de l'âge des substances séparées sur une colonne OV-1 3% d'un extrait urinaire de souris ♂ et ♀. La somme des rapports de surface des pics de chaque âge est exprimée en % de la valeur trouvée pour le plus jeune âge.

FABRICATION SUISSE

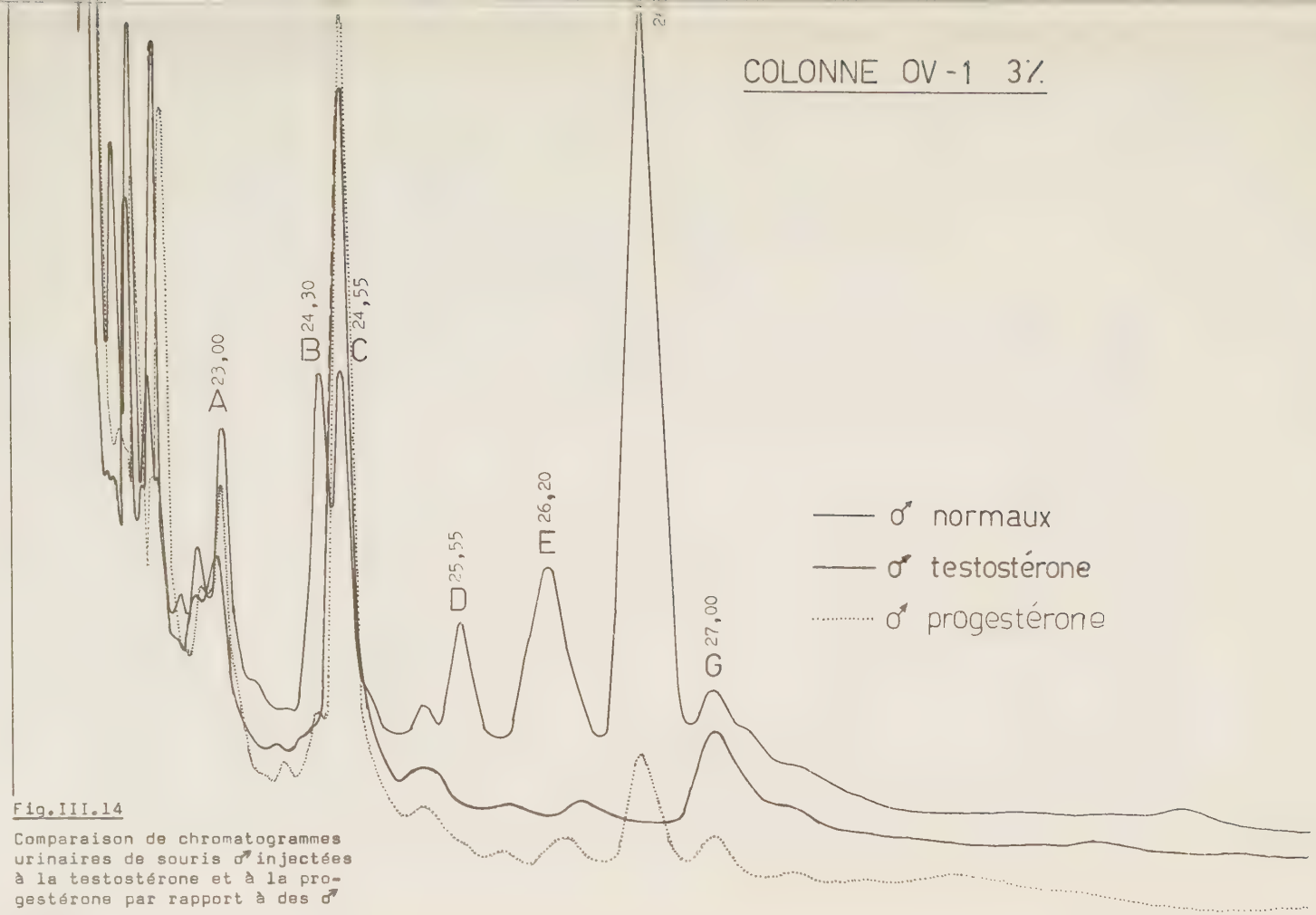


Fig.III.14

Comparaison de chromatogrammes urinaires de souris ♂ injectées à la testostérone et à la progestérone par rapport à des ♂ normaux

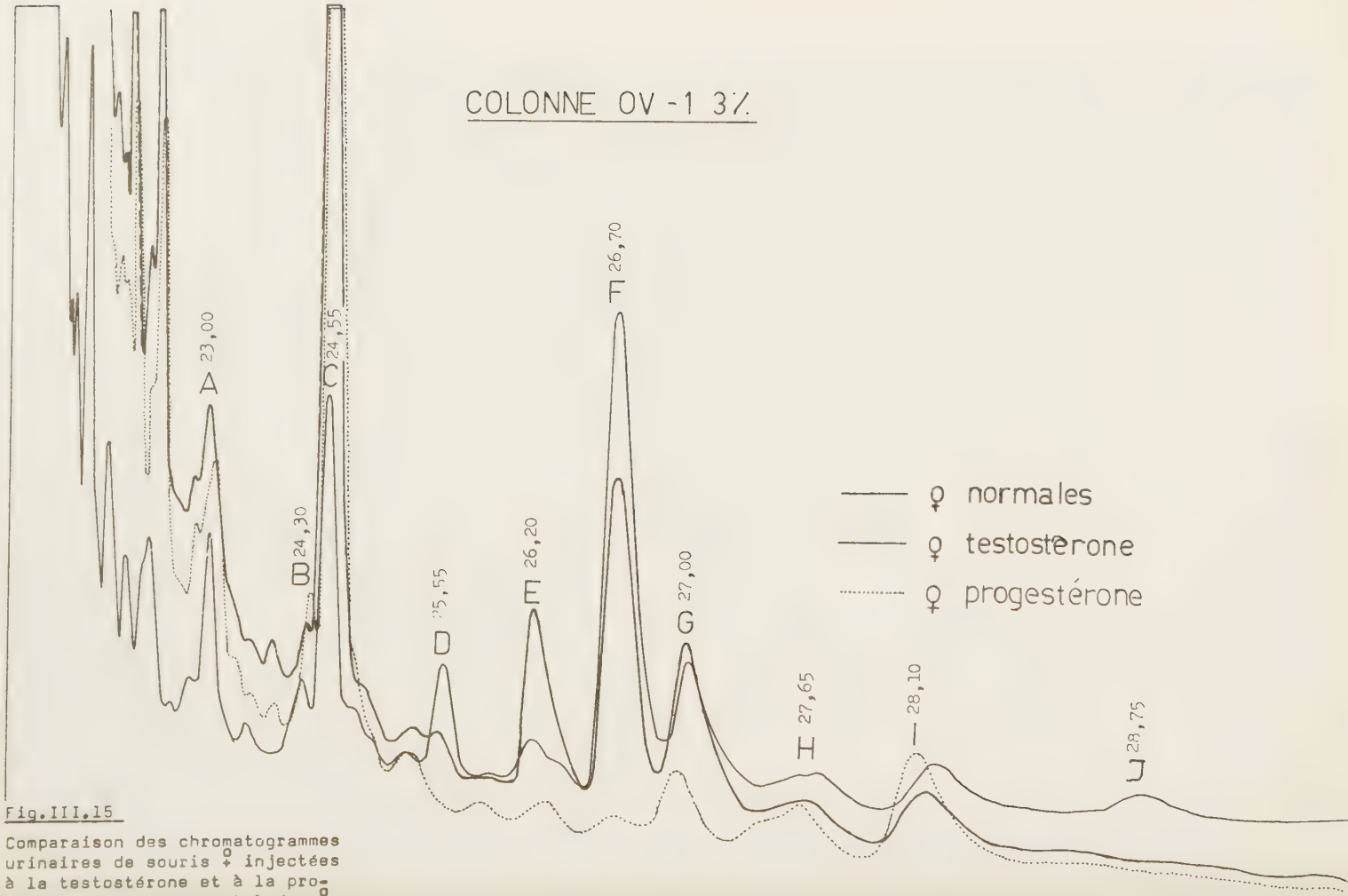
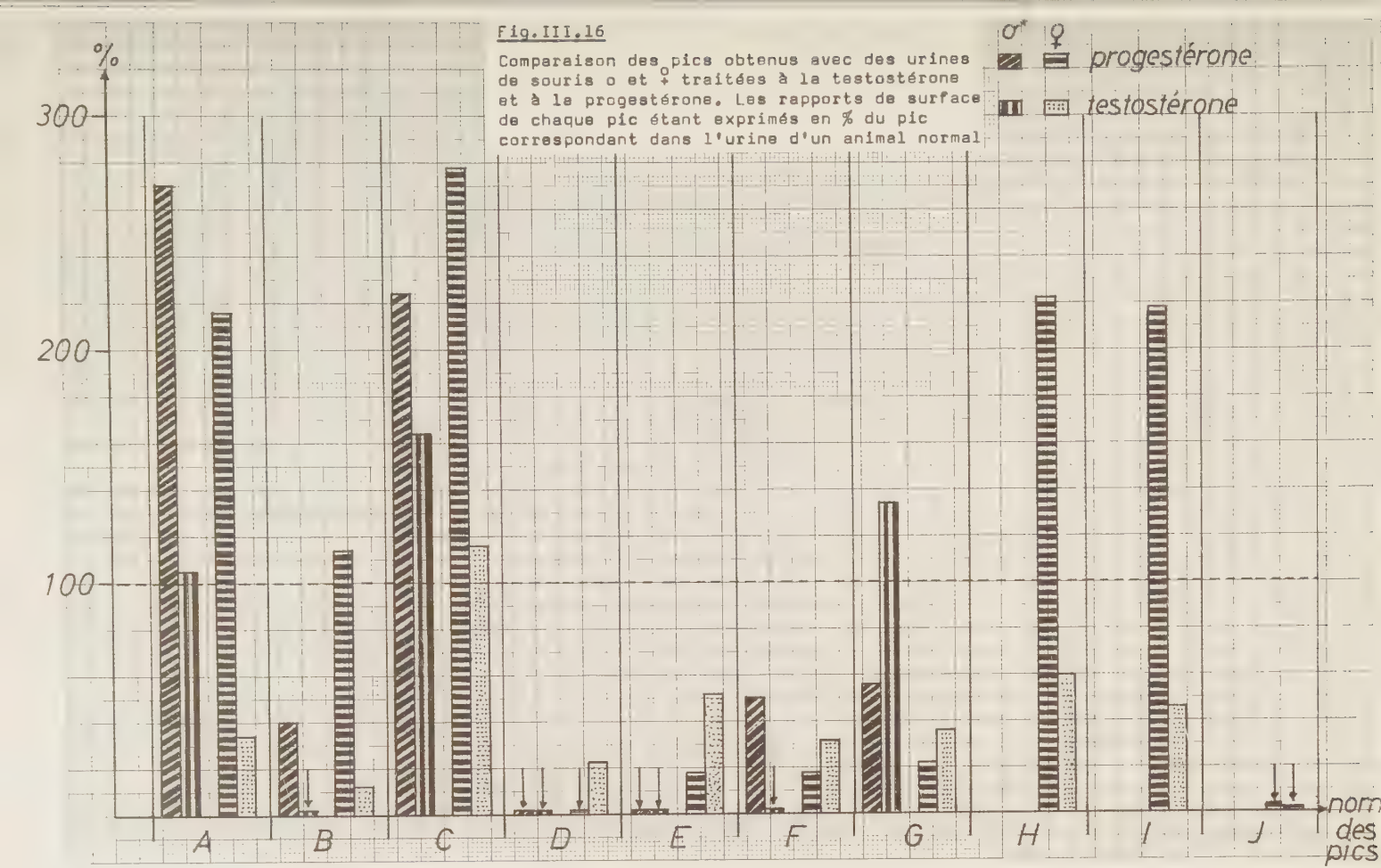


Fig.III.15

Comparaison des chromatogrammes urinaires de souris ♀ injectées à la testostérone et à la progestérone, par rapport à des ♀

Fig. III.16

Comparaison des pics obtenus avec des urines de souris ♂ et ♀ traitées à la testostérone et à la progestérone. Les rapports de surface de chaque pic étant exprimés en % du pic correspondant dans l'urine d'un animal normal



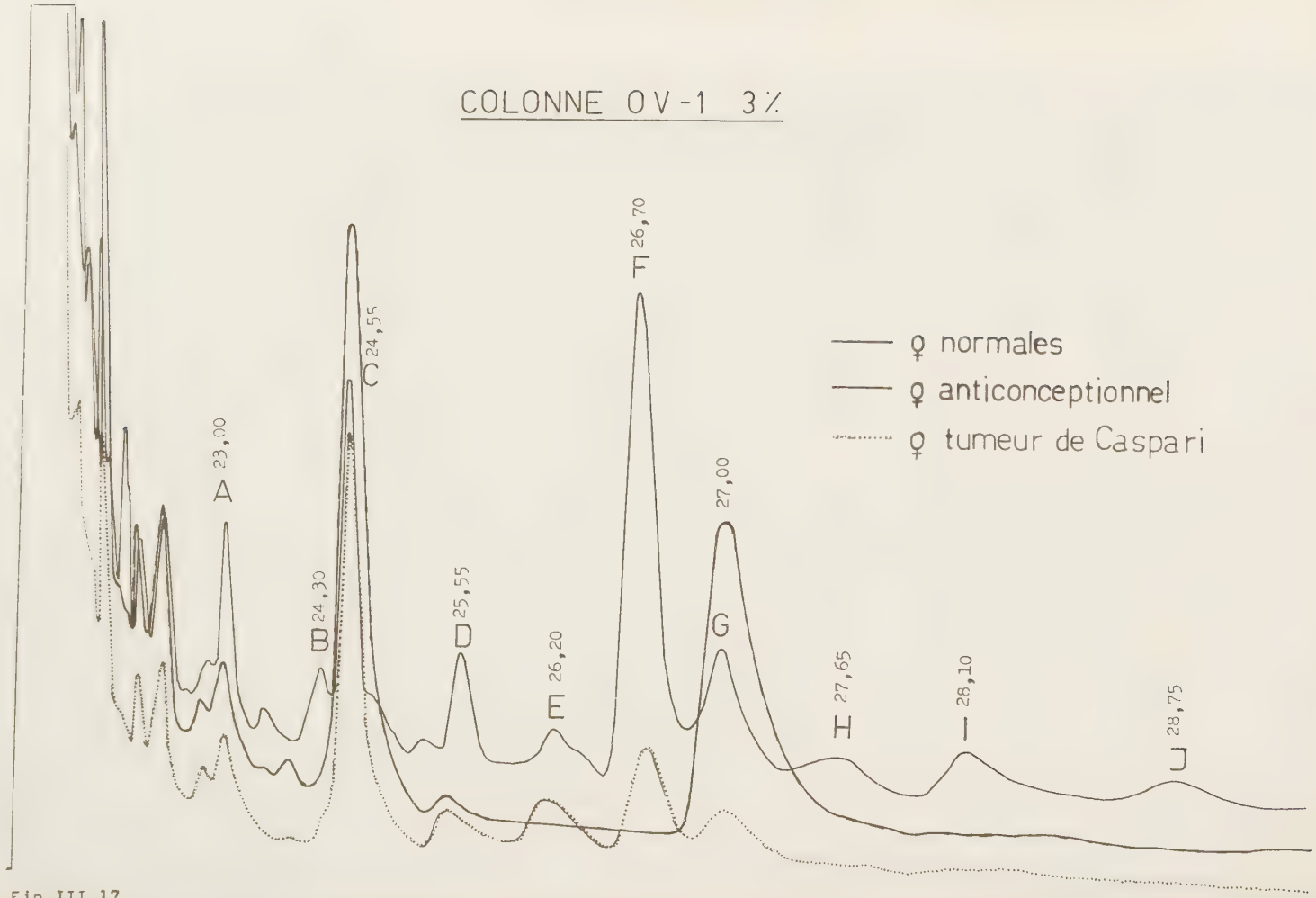
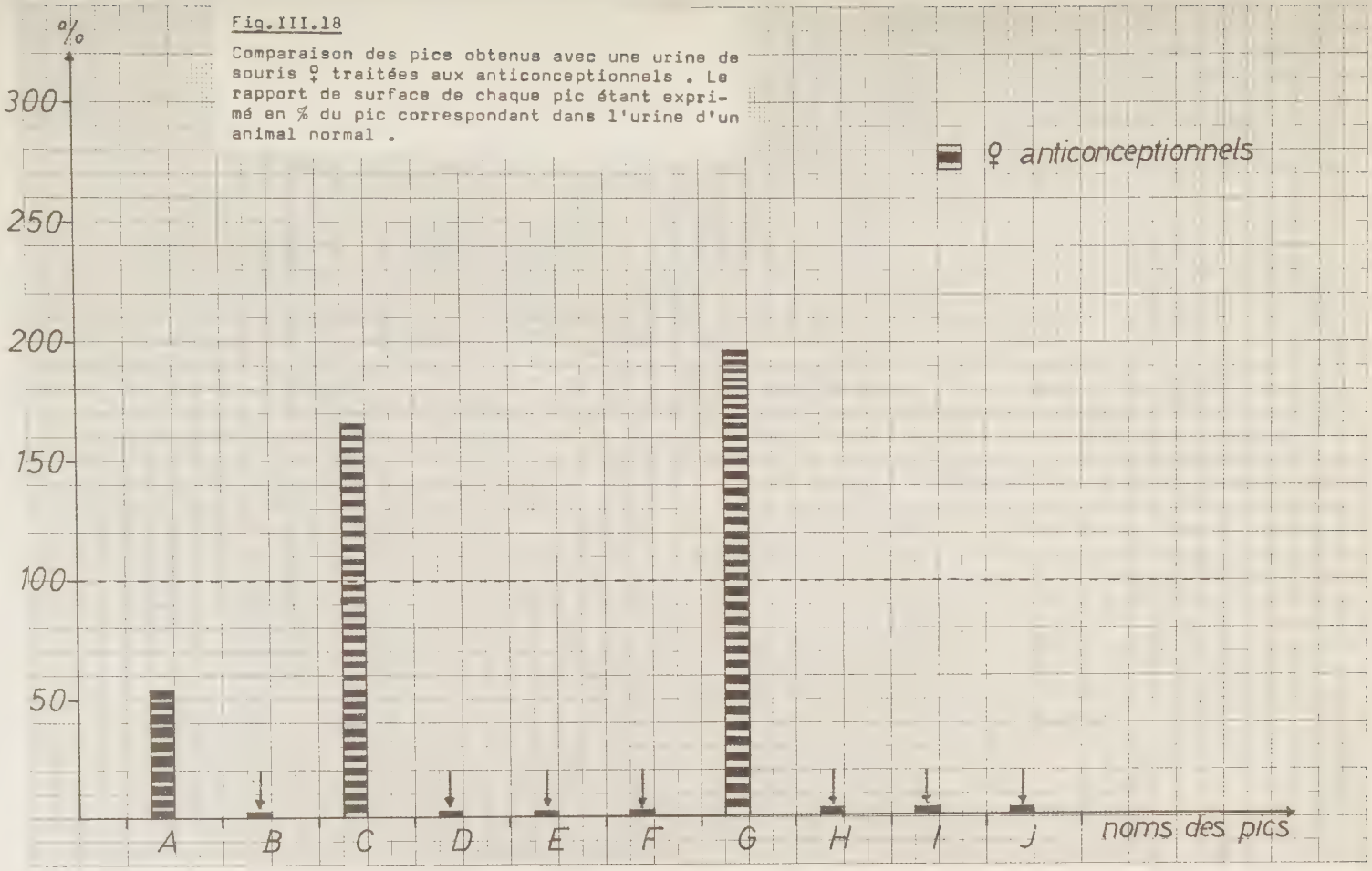


Fig.III.17

Comparaison des chromatogrammes d'urines de souris ♀ injectées

Fig.III.18

Comparaison des pics obtenus avec une urine de souris ♀ traitées aux anticonceptionnels . Le rapport de surface de chaque pic étant exprimé en % du pic correspondant dans l'urine d'un animal normal .



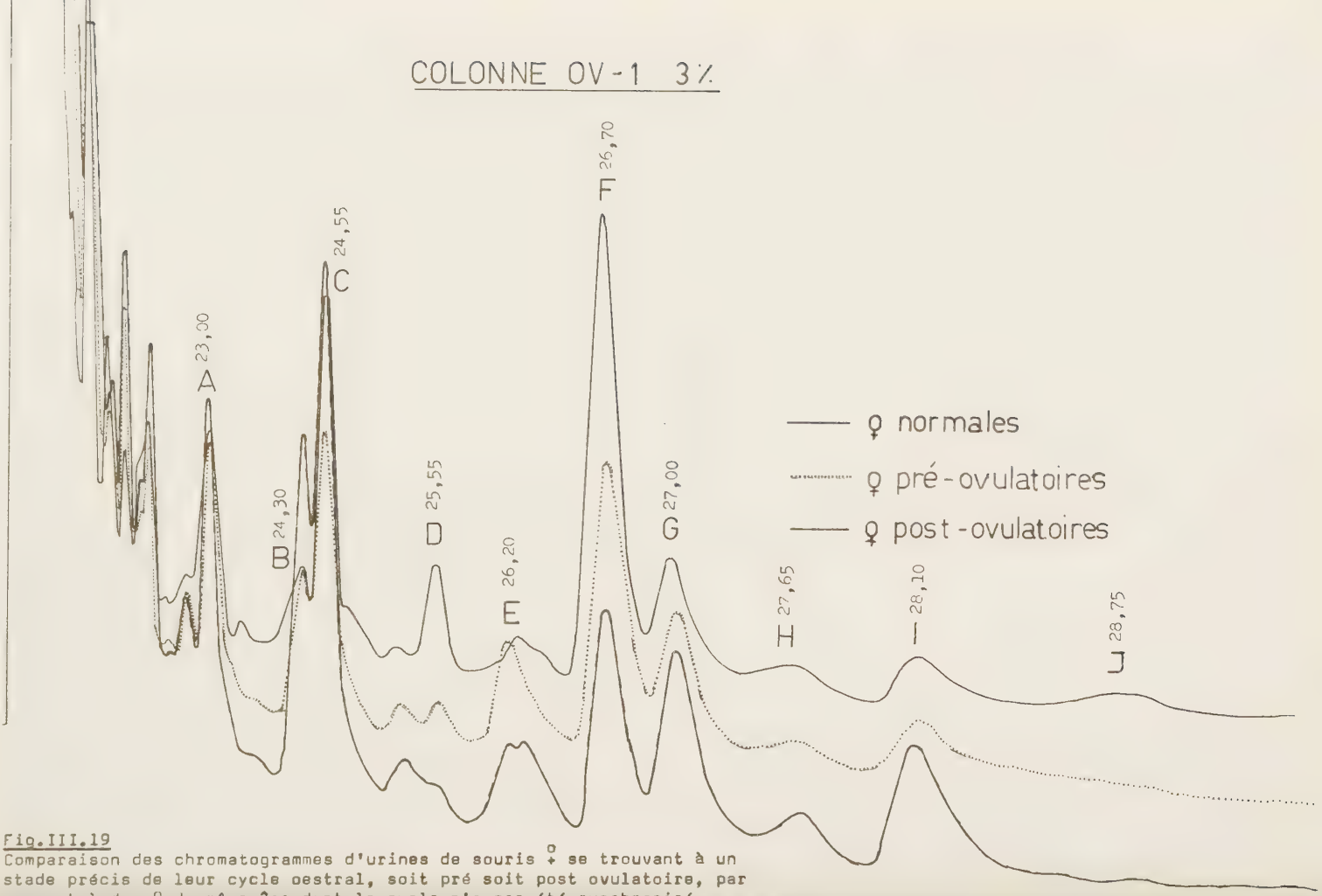


Fig.III.19
Comparaison des chromatogrammes d'urines de souris ♀ se trouvant à un stade précis de leur cycle oestral, soit pré soit post ovulatoire, par rapport à des ♀ du même âge dont le cycle n'a pas été synchronisé .

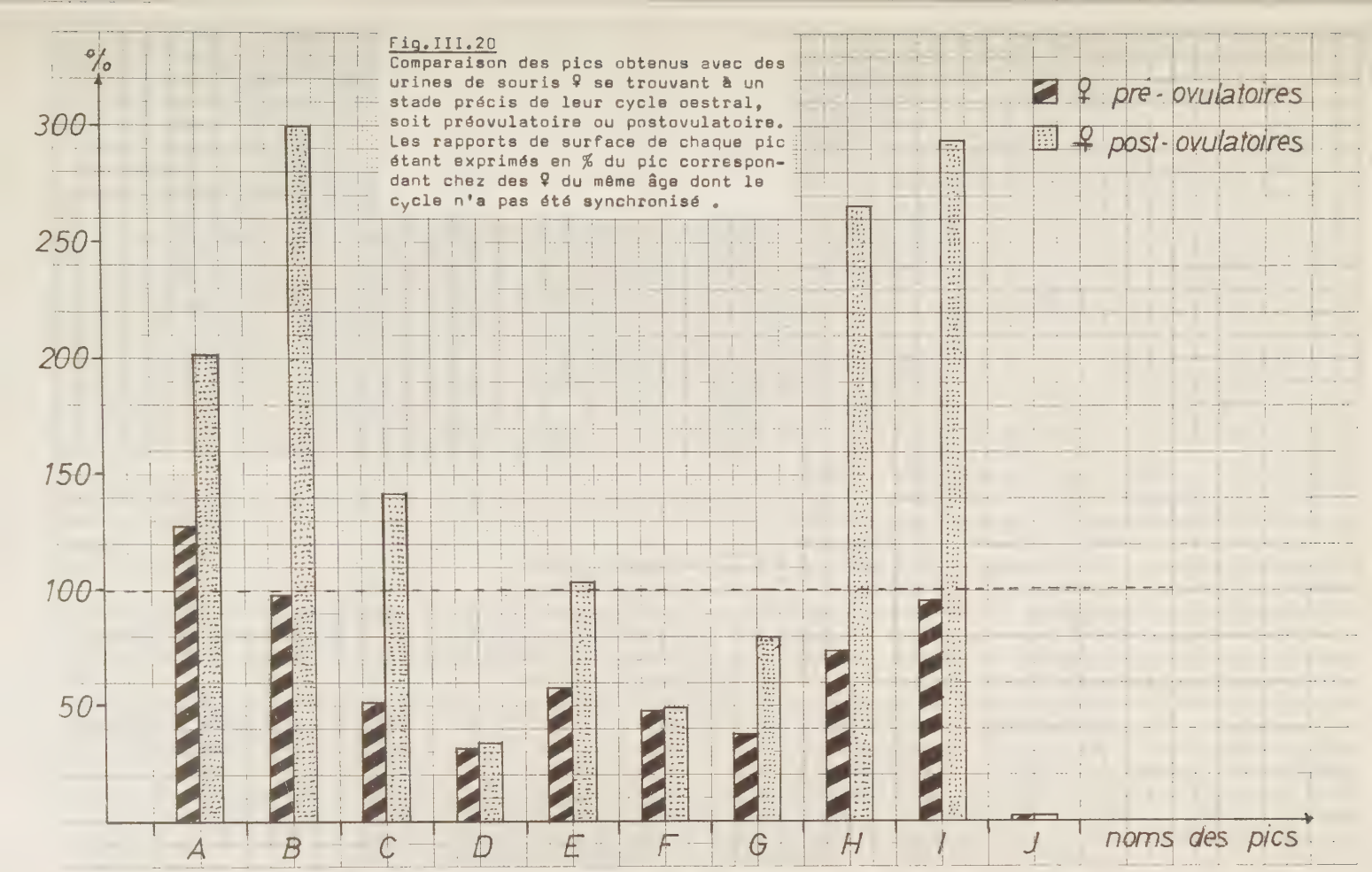


Fig.III.20
Comparaison des pics obtenus avec des urines de souris ♀ se trouvant à un stade précis de leur cycle oestral, soit préovulatoire ou postovulatoire. Les rapports de surface de chaque pic étant exprimés en % du pic correspondant chez des ♀ du même âge dont le cycle n'a pas été synchronisé .

Fig.III.21

Comparaison des pics obtenus avec une urine de souris ♀ porteuse de tumeur mammaire. Le rapport de surface de chaque pic étant exprimé en % du pic correspondant chez des ♀ normales .

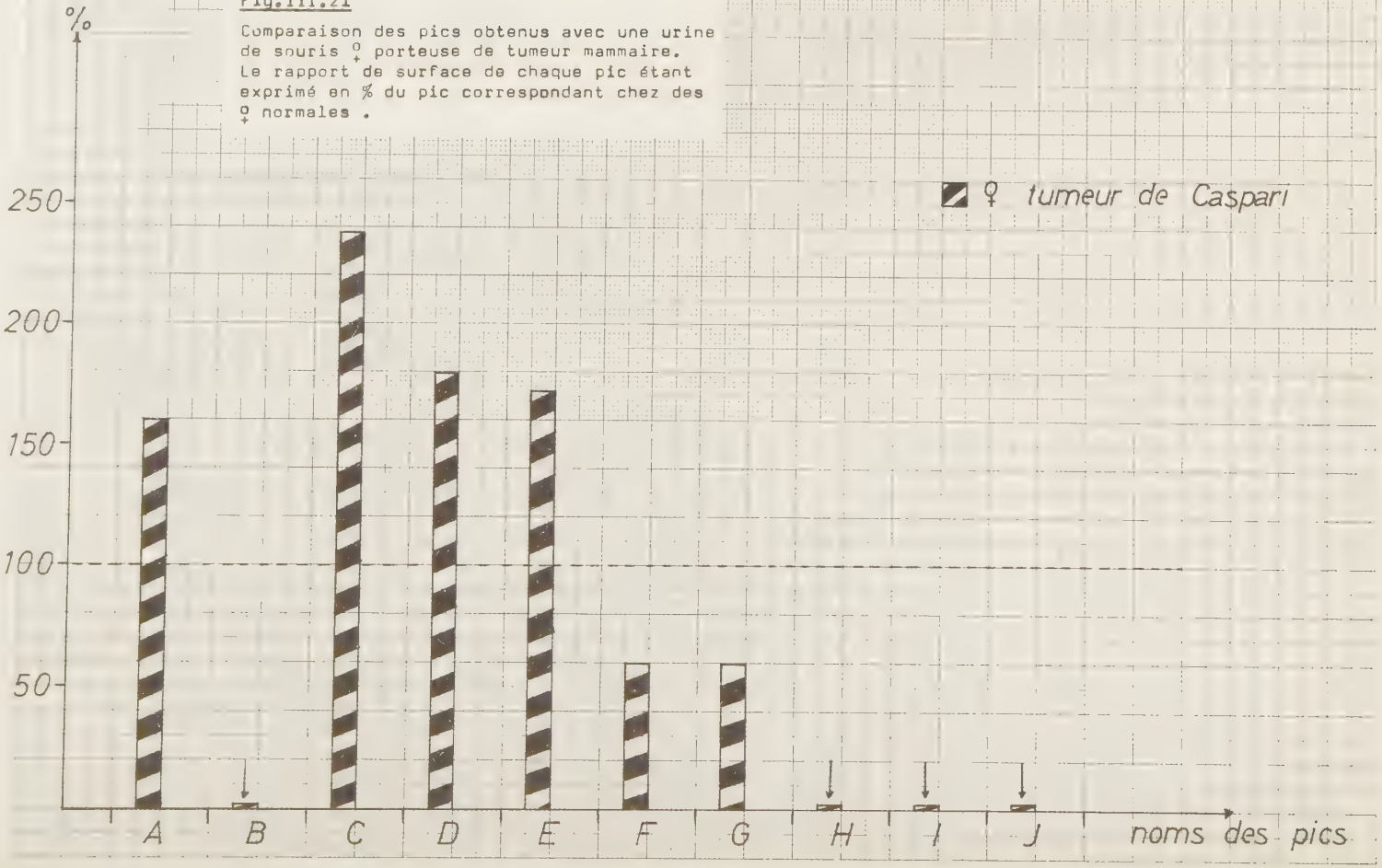
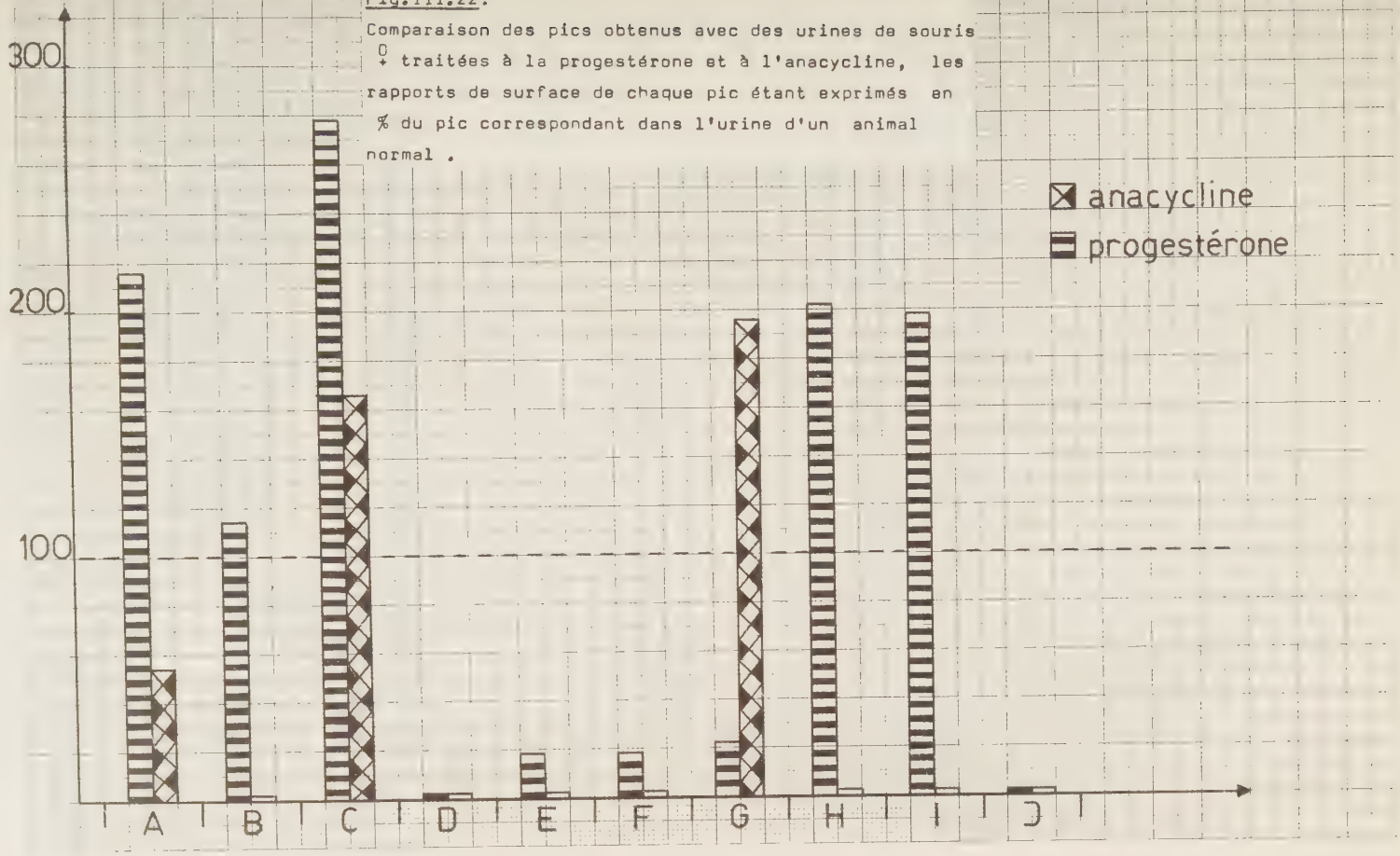


Fig.III.22:

Comparaison des pics obtenus avec des urines de souris ♀ traitées à la progestérone et à l'anacycline, les rapports de surface de chaque pic étant exprimés en % du pic correspondant dans l'urine d'un animal normal .



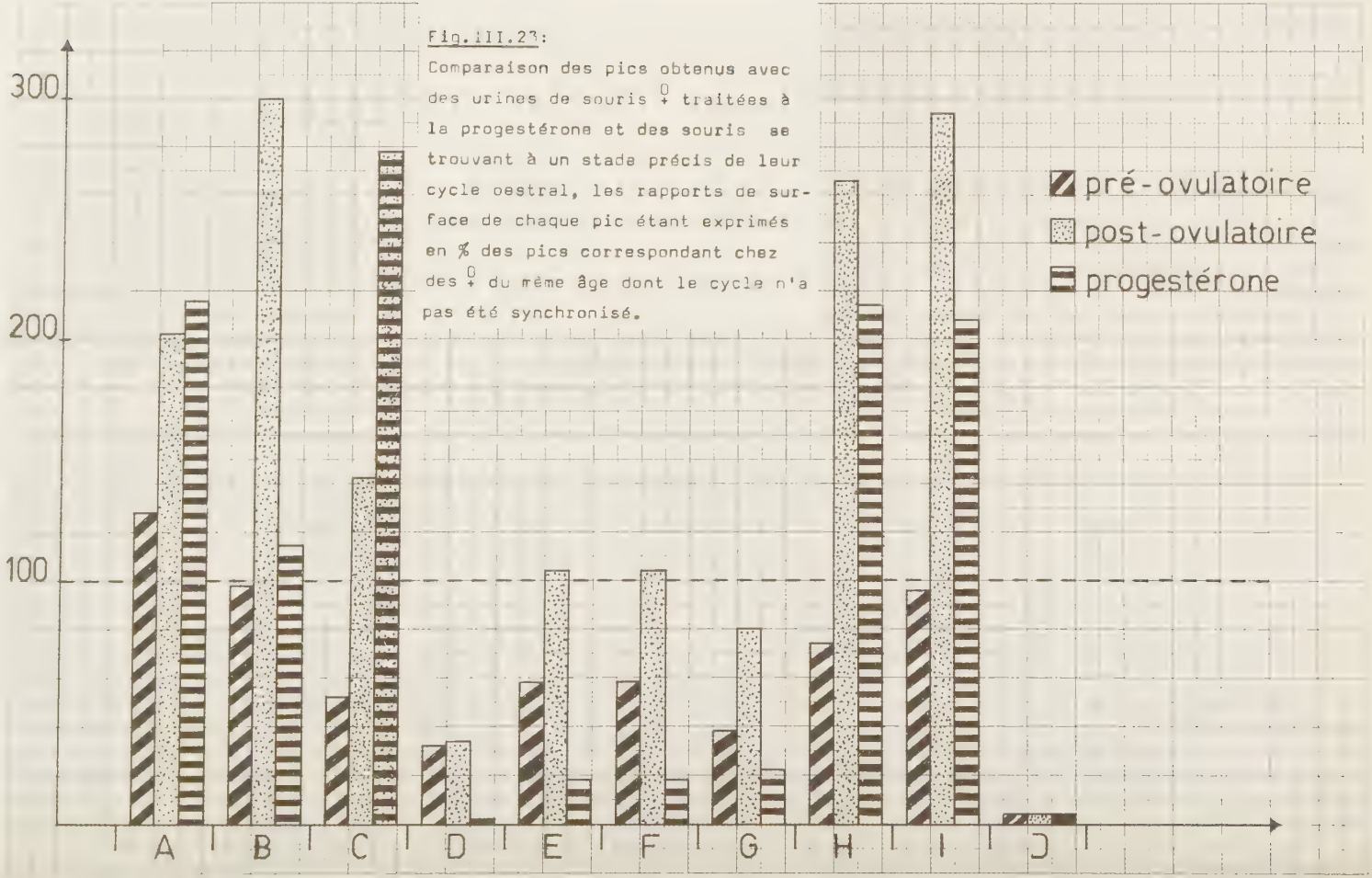


Fig.III.23:
Comparaison des pics obtenus avec des urines de souris ♀ traitées à la progestérone et des souris se trouvant à un stade précis de leur cycle oestral, les rapports de surface de chaque pic étant exprimés en % des pics correspondant chez des ♀ du même âge dont le cycle n'a pas été synchronisé.

D I S C U S S I O N G E N E R A L E

Comme nous l'avons dit dans l'avant-propos de ce travail, le dosage des stéroïdes urinaires de la souris, et spécialement du groupe des 17-oxo-stéroïdes, devait nous permettre, parallèlement à d'autres moyens, de suivre l'évolution fonctionnelle du système endocrinien de la souris mis sous l'effet d'un anticonceptionnel et dont l'action tumorale ou anti-tumorale sur la glande mammaire doit encore être déterminée. Etant donné que nos connaissances sur ces hormones dans l'urine de cet animal sont loin d'être suffisantes, la recherche de méthodes appropriées à leur dosage et à leur identification s'est avérée nécessaire pour répondre au mieux au but recherché.

Compte tenu des observations et des résultats obtenus avec les méthodes employées en clinique humaine, nous avons commencé par les appliquer à l'urine de souris. L'expérimentation ainsi engagée nous conduit à constater que ces méthodes ne peuvent pas être telles quelles appliquées au cas qui nous occupe et que de nombreuses questions restent ouvertes; nous aimerions ici rappeler les principales d'entre elles.

Nature réelle de substances dosées

1° Aspect biochimique :

1.1. Présence de substances Zimmermann positives séparées par la CCM

L'examen de nos résultats montre que l'extrait urinaire de souris contient des substances Zimmermann positives, de nature polaire et dont la majorité migre sur une plaque de CCM dans une zone où migrent habituellement les $C_{19}O_3$.

Parmi les substances séparées, on constate que certaines possèdent des Rf identiques ou proches de certains $C_{19}O_3$ de référence rencontrés dans l'urine humaine (11-oxo-androstérone, 11-oxo-étiocholanolone, 11β-OH-androstérone et

11β-OH-étiocholanolone).

Par exemple, l'examen des figures (I.7; I.11; I.13 et I.15-17) nous a montré la présence dans l'extrait urinaire de souris d'une bande Zimmermann positive qui migre au niveau de la 11-oxo-androstérone, d'une seconde bande au niveau de la 11-oxo-étiocholanolone et d'une troisième au niveau de la 11β-OH-androstérone.

Si l'on ne retient que le seul fait de la présence de substances Zimmermann positives de nature semblable à celle des $C_{19}O_3$ dans l'extrait urinaire de souris, on constate un bon accord de nos résultats avec ceux de Wilson (22).

Wilson a, en effet, publié en 1958 déjà un travail dans lequel il a étudié la nature des 17-oxo-stéroïdes et des corticoïdes dans le plasma et l'urine de souris porteuses de tumeurs. Cette étude a été faite à la suite de l'observation faite sur les animaux en question de symptômes semblables à ceux que l'on trouve dans la maladie de Cushing chez l'homme.

Pour mieux comparer nos résultats à ceux de Wilson, il est utile de décrire rapidement la méthode d'analyse employée par cet auteur, qui se résume comme suit :

1) hydrolyse enzymatique de l'urine (pool de 1800 ml) par la β-glucuronidase (ketodase);

2) extraction éthérée des stéroïdes libres : préparation d'une fraction $\underline{NF}_1$;

3) hydrolyse acide de la phase aqueuse résultant de l'extraction de ci-dessus et nouvelle extraction des stéroïdes libérés par l'hydrolyse acide : préparation d'une fraction $\underline{NF}_2$.

Chaque fraction est chromatographiée sur colonne, ensuite sur papier dans différents systèmes de solvants. Les spots sont élués et identifiés par différentes méthodes physico-chimiques.

On peut résumer les résultats décrits par Wilson dans le tableau suivant :

tion	Stéroïdes trouvés dans l'extrait urinaire de souris(Wilson)
1	$C_{19}O_3$ inconnu : migre sur papier au niveau de 11β-OH-étiocholanolone $C_{19}O_3$ inconnu : migre sur papier au niveau de 11-oxo-étiocholanolone $C_{19}O_3$ probablement identifié comme 11β-OH-androstane-3,17-dione $C_{19}O_3$ ou $C_{19}O_2$: inconnu qui migre entre ces deux groupes $C_{19}O_3$ ou $C_{19}O_2$: inconnu mais qui pourrait être de nature non saturée comme Δ 3,5-androstadiène-17-one ou Δ 2-androstène-17-one.
2	$C_{19}O_3$ probablement identifié comme 11β,17α-dihydroxy-Δ 4-androstène-3-one $C_{19}O_3$ probablement identifié comme 11β-OH-Δ 4- androstène-3,17-dione

Si l'on compare maintenant nos résultats avec ceux de Wilson, sans tenir compte des différences de races et des conditions dans lesquelles les animaux ont été employés, on constate qu'il existe une concordance sur la présence des $C_{19}O_3$ ou $C_{19}O_2$ d'une part, mais qu'il existe par contre une discordance sur l'identité structurale des substances séparées, d'autre part. Il est donc difficile de trouver une corrélation valable entre les deux séries de résultats et l'interprétation en parallèle de l'identité de ces substances dans les deux cas est pour l'instant impossible. Il n'en reste pas moins que l'extrait urinaire de souris préparé par Wilson et par nous contient des substances Zimmermann positives.

1.2. Type de conjugaison des substances séparées

La séparation de l'extrait urinaire en deux fractions, dont l'une contient les stéroïdes provenant des gluco-conjugués et dont l'autre contient les stéroïdes provenant

des sulfo-conjugués nous a permis de constater la prédominance des produits dérivés des gluco-conjugués.

Cette constatation est vérifiée par l'analyse chromatographique d'une urine de souris femelle n'ayant pas subi l'hydrolyse enzymatique. En effet, les chromatogrammes des fig. D.1 et D.2 nous montrent, sur colonne OV-1, l'absence totale des pics qui sont habituellement séparés dans le cas d'une urine hydrolysée. On note cependant, la présence du pic A et des traces des pics B et H dans l'urine non hydrolysée.

Ce résultat confirme donc l'état de conjugaison de ces substances dans l'urine et indique en même temps qu'elles sont probablement aussi présentes partiellement à l'état libre, puisque le pic A est retrouvé dans une urine non hydrolysée.

Il est intéressant de constater que si ces substances sont de nature stéroïdique et en majeure partie sous forme de gluco-conjugué dans l'urine de souris, les stéroïdes de l'urine de rat sont excrétés en majeure partie sous forme de sulfo-conjugués (11)(15)(10).

1.3. Recherches préliminaires sur la nature de la structure chimique des substances hydrolysées puis séparées par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'analyse par la CPG nous a montré que les profils stéroïdiques de l'extrait urinaire de souris sont différents de ceux de l'urine humaine analysée dans les mêmes conditions ou dans des conditions très proches.

Les tentatives d'identification des pics séparés par le critère du nombre stéroïdique de Vandenheuvel, par rapport aux références disponibles nous ont permis l'identification probable de quatre "stéroïdes" dont un seul appartient au groupe des $C_{19}O_3$ (voir tableau III.4, p. 93).

On constate en plus que les pics ont des nombres téroïdiques dans les trois colonnes OV-1, OV-17 et OV-225, qui indique que leur structure est probablement dérivée de 'androstane et du pregnane.

Si l'on essaie de comparer les résultats obtenus par a couche mince avec ceux de la CPG pour tenter d'établir e relation quelconque entre les produits ainsi séparés, constate que la présence de substances Zimmermann positives éparées par la CCM n'est pas confirmée par la CPG à l'exception e la présence probable de la 11-oxo-androstérone. Ceci laisse supposer que les substances Zimmermann positives migrant ans la zone de $C_{19}O_3$ peuvent être, soit de structure non téroïdique mais possédant des groupes cétoniques qui réagis-ent avec les réactifs de Zimmermann, soit des dérivés de téroïdes avec des groupements cétoniques et une configuration habituelle de la molécule, soit des stéroïdes ou des 17-oxo-téroïdes, mais que nous n'avons pas pu identifier par manque e références.

Cependant, il est essentiel de constater que dans 'extrait urinaire de souris, nous avons

- une absence totale de l'androstérone, de l'étiocholanolone et de la déhydroépiandrostérone; cette dernière est présente dans l'urine de rat (16);
- une absence des 11-oxo-étiocholanolone, 11β-OH-androstérone, 11β-OH-étiocholanolone ($C_{19}O_3$), du pregnandiol et du pregnantriol, ces métabolites étant cependant présents dans l'urine humaine;
- une absence de 11β-OH-Δ^4-androstène,3,17-dione trouvée par Wilson.

Comme nous ne disposions pas des références correspondant aux deux autres stéroïdes probablement identifiés par ilson, nous ne pouvons pas, pour l'instant, confirmer ou nfirmer leur présence dans l'extrait urinaire de souris.

En raison du manque d'informations relatives à la structure des autres pics séparés par la CPG, mais non identifiés par le critère du nombre stéroïdique d'une part, et pour être certain de l'identité de structure des autres pics possibles : la 11-oxo-androstérone, la pregnanolone, la testostérone et le 5α-androst-2-ene-11β-OH-17-one, d' autre part, nous avons demandé au Professeur J.A.Gustafsson* de nous analyser deux extraits urinaires de souris mâles et femelles (préparés à partir de 100 ml d'urine chacun) par la chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectremètre de masse. Chaque extrait est séparé en deux fractions de la colonne d'alumine F_2 et F_3 (voir méthode p. 73).

Les résultats obtenus par Gustafsson sont les suivants :

1) Fraction F_2 d'une urine de souris mâles :

pas de stéroïdes détectables.

Fraction F_3 d'une urine de souris mâles :

pas de stéroïdes détectables.

2) Fraction F_2 d'une urine de souris femelles :

pas de stéroïdes détectables.

Fraction F_3 d'une urine de souris femelles :

présence de stéroïdes du type C_{21} hydroxylés en C_{16}.

Malgré le fait que ces résultats soient en quelque sorte inattendus, ils sont, à notre avis, très intéressants.

En effet, si la spectrométrie de masse nous confirme que les différents pics séparés par la CPG d'un extrait urinaire de souris, analysé dans les mêmes conditions qu'un extrait urinaire humain, ne correspondent pas à des stéroïdes, plusieurs questions importantes se posent :

quelle est la nature exacte de ces substances ? quelle est la raison pour laquelle l'extrait urinaire de souris ne contient pas des métabolites stéroïdiques et spécialement les 17-oxo-stéroïdes ? comment sont métabolisés les précurseurs des

(*) Nous remercions le Prof.J.A.Gustafsson (Karolinska Institut) pour l'analyse des extraits en CPG-MS.

17-oxo-stéroïdes, du pregnandiol et du pregnantriol, tels que l'androstanedione, la testostérone et la progestérone, etc. ?

Ces questions seront encore évoquées au chapitre suivant.

2° Aspect biologique :

Les perturbations apportées aux profils des chromatogrammes d'extraits urinaires de souris par l'administration de surcharges hormonales nous indiquent que les substances détectées, qui pourraient ne pas être des stéroïdes, sont cependant en relation avec le métabolisme endocrinien sexuel de la souris.

L'animal normal les élimine dans son urine sous forme de conjugués. Leur taux varie en fonction de l'âge démontrant ainsi l'existence d'une évolution physiologique et d'une différenciation sexuelle qui se manifeste à partir de 6-7 mois d'âge.

L'animal surchargé par des stéroïdes bien définis présente des profils modifiés qualitativement (disparition de certains pics du chromatogramme qui sont normalement présents dans l'extrait urinaire de l'animal normal) et quantitativement (variation du taux par rapport aux animaux normaux).

Nous avons constaté également une certaine ressemblance dans le comportement de quelques pics appartenant à des animaux traités, entre les profils dûs à la surcharge en progestérone et à l'anacycline et le profil des animaux se trouvant dans la phase post-ovulatoire de leur cycle oestral. En plus, nous avons aussi constaté une certaine corrélation entre le profil des pics des animaux des deux sexes qui ont reçu de la progestérone et ceux qui ont reçu de la testostérone (voir p. 104).

Toutes ces constatations appuyent, à notre avis, l'idée que les substances éliminées dans l'urine de la souris sont en rapport métabolique plus ou moins direct avec la progestérone et la testostérone.

A ce point, on doit donc se poser à nouveau la question de savoir de quelle manière sont métabolisés les précurseurs des 17-oxo-stéroïdes, du pregnandiol et du pregnanetriol dans l'organisme de la souris.

Il est intéressant de remarquer que lorsque l'on administre de la testostérone ou de la progestérone aux souris, on modifie les surfaces des pics séparés, mais aucun nouveau pic susceptible d'être un métabolite de ces hormones n'apparaît dans le chromatogramme.

Chez l'homme, il est bien établi que la testostérone est principalement catabolisée en androstérone et en étiocholanolone et que la progestérone est principalement catabolisée en pregnanediol et pregnanetriol; la progestérone donne également des corticoïdes tels que le cortisol, la cortisone et la corticostérone (141)(142).

Donc, théoriquement, et en admettant que ces deux hormones suivent le même chemin catabolique chez la souris, on devrait trouver leurs métabolites dans l'urine de cet animal.

Or, comme nous pouvons le constater, aucun métabolite de ces précurseurs n'a pu être mis en évidence dans l'extrait urinaire de souris, ce qui conduit à conclure que les voies de dégradation de la testostérone et de la progestérone ne sont très probablement pas les mêmes que chez l'homme.

Si le catabolisme de la progestérone est mal étudié chez la souris, par contre celui de la testostérone a fait l'objet de plusieurs travaux, in vivo ou in vitro, employant les méthodes de détection radioactives.

Avec l'administration de la testostérone radioactive (ou l'androstenedione radioactive) aux souris, Kasai et coll. (143); Appelgreen (144)(145) et Arimasa (146) ont démontré que la radioactivité s'accumule dans différents organes de cet

animal, notamment dans les glandes surrénales, le foie, les testicules, les vésicules séminales, la prostate, la bile et les reins.

Ces auteurs ont démontré également que la testostérone est principalement catabolisée en dihydrotestostérone (17β-hydroxy-5α-androstane-3-one) et en androstanediol (5α-androstane-3α,17β-diol), cette dernière substance étant formée à partir de la dihydrotestostérone (143).

Signalons encore que dans une expérience in vitro, Arimasa a obtenu un autre métabolite, l'épitestostérone (17α-hydroxy-androst-4-ene-3-one) à partir de la testostérone (ou l'androstenedione) marquée et incubée en présence d'un homogénat de reins de souris. Il a identifié également le 5α-androstane,3α-17β-diol, le 17β-hydroxy-5α-androstane-3-one, l'androstérone, l'épiandrostérone, l'androstanedione et le 5α-androstane,3β,17β-diol. Tous ces métabolites se trouvent sous forme de trace (146).

En définitive, il est évident que la testostérone est métabolisée par les différents organes de la souris jusqu'à la formation de l'androstanediol. On note cependant qu'aucun des auteurs précités n'a fait mention de ce qui se passe au niveau de l'excrétion urinaire. Appelgreen (144) a pourtant signalé que la radioactivité apparait dans l'urine de souris 20 minutes et 4 heures après l'administration de la testostérone marquée, sans spécifier la nature des substances responsables de ce phénomène. Le mécanisme de l'élimination urinaire des stéroïdes chez la souris est donc loin d'être élucidé.

Pour ce qui est de notre expérimentation, comment expliquer l'absence des hormones stéroïdes dans l'extrait urinaire de souris ? A ce sujet, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées :

a) Généralement, chez l'homme les hormones stéroïdes sont éliminées dans l'urine sous forme de métabolites conjugués qui ont subi, tout au long des processus métaboliques,

des modifications moléculaires fonctionnelles sans que le noyau de base (cyclo-pentano-pérhydro-phenanthrène) soit ouvert. Or, chez la souris, il est possible que l'élimination urinaire de ces hormones aboutisse à la formation de métabolites non stéroïdiques, mais probalement cétoniques, ce qui expliquerait éventuellement la relation entre les substances "non identifiées" que nous avons séparées dans l'extrait et l'effet des hormones de surcharge sur celles-ci.

b) On pourrait également supposer que les hormones stéroïdes de la souris ne sont pas nécessairement conjuguées, comme c'est le cas chez l'homme, à l'acide glucuronique ou à l'acide sulfurique, mais éventuellement à une autre substance avec un type de liaison résistant à l'action hydrolytique de la β-glucuronidase et des sulfatases. De ce fait, elles garderaient leur hydrosolubilité et se trouveraient ainsi éliminées lors de l'extraction dans les phases aqueuses (lavage au NaOH et H_2O).

Nous écartons cependant cette hypothèse pour la simple raison que l'hydrolyse acide (HCl 15 vol/100 vol; 15 minutes sous reflux) de l'ensemble des phases aqueuses résultant de chaque manipulation et l'analyse de l'extrait préparé selon la méthode générale n'a pas donné de pics sur le chromatogramme.

c) Une autre hypothèse est que les stéroïdes proprement dits de la souris sont excrétées dans l'urine sous forme de traces non détectables par la chromatographie en phase gazeuse. Dans ce cas, le volume urinaire employé par nous au départ serait insuffisant pour une telle détection.

Notons, à ce propos, que le choix de ce volume a été fait en tenant compte, d'une part des données connues pour l'analyse des stéroïdes chez l'homme et, d'autre part, des difficultés et des impératifs de durée liés au recueillement de l'urine pour des dosages de routine.

CONCLUSIONS GENERALES

Nos recherches sur les 17-oxo-stéroïdes dans l'urine de souris par les méthodes les plus couramment utilisées en clinique humaine nous permettent de formuler les conclusions générales suivantes :

1. L'urine de cet animal se prête difficilement à l'analyse des stéroïdes par les méthodes classiques sans faire appel à d'autres méthodes plus élaborées. C'est ainsi que la méthode la plus employée pour le dosage global de ces hormones par la réaction de Zimmermann après hydrolyse acide de l'urine n'a pas permis leur quantification. La présence d'une forte pigmentation dont la majeure partie est de couleur pourpre (couleur caractéristique de la réaction de Zimmermann) a rendu ce dosage impraticable sur l'extrait brut.

   Le remplacement de l'hydrolyse acide par une hydrolyse enzymatique combinée à une solvolyse après extraction des stéroïdes conjugués par l'acétate d'éthyle de l'urine (pH 1.0; 20% NaCl) n'a pas amélioré la situation. Une pigmentation moins intense, mais toujours de couleur pourpre s'est formée pendant l'extraction des conjugués.

   Finalement, l'extraction préalable des stéroïdes conjugués par une résine synthétique de polystyrène, l'amberlite XAD-2, suivie d'une hydrolyse enzymatique et d'une purification par une colonne d'alumine nous a permis de préparer un extrait suffisamment propre pour les dosages physico-chimiques.

2. Les premiers essais de séparation de l'extrait urinaire par la chromatographie en couche mince nous ont montré que ce dernier contient des substances Zimmermann positives dont la majorité migre dans une zone où migrent habituellement les $C_{19}O_3$ (11-oxy-17-oxo-stéroïdes) de l'urine humaine. L'extrait contient également quelques substances Zimmermann positives qui migrent dans la zone de $C_{19}O_2$ (11-desoxy-17-oxo-stéroïdes). Dans cette zone, on distingue

nettement la présence d'une bande qui se colore fortement avec les réactifs de Zimmermann et qui migre au-dessus de l'androstérone.

L'extrait urinaire a montré sur CCM l'absence totale de l'androstérone, de l'étiocholanolone et de la déhydro-épiandrostérone.

3. La séparation de l'extrait en fraction glucuronique et en fraction sulfatée, par une hydrolyse différentielle (β-glucuronidase + solvolyse) et l'analyse de ces deux fractions par la couche mince nous a montré que la plupart des substances Zimmermann positives se trouvent en majorité dans la fraction glucuronique plutôt que dans la fraction sulfatée. Ce résultat a été confirmé par la chromatographie en phase gazeuse avec l'analyse comparative d'un extrait provenant d'une urine de souris non hydrolysée et hydrolysée (hélicase). En conséquence, les substances qui se séparent par la CCM ou par la CPG se trouvent très probablement dans l'urine, en majeure partie sous forme conjuguée.

4. L'analyse d'un extrait urinaire de souris mâles et femelles, par une méthode employée en clinique humaine pour le dosage des 17-oxo-stéroïdes, du pregnanediol et du pregnanetriol urinaires, a montré que le "profil stéroïdique" obtenu par la CPG est différent de celui de l'homme.

La spectrométrie de masse a pour l'instant montré sur deux deux extraits urinaires mâle et femelle que la majeure partie des pics séparés par la CPG ne présente pas la structure stéroïdique.

5. Malgré que ces substances pourraient ne pas être des stéroïdes, elles sont indéniablement en relation avec le métabolisme des hormones sexuelles de la souris, en raison du fait que les différentes surcharges hormonales de l'animal (progestérone, testostérone, anticonceptionnel, etc.) les modifient de façon évidente, qualitativement et quantitativement.

6. La quantification des pics séparés, par une méthode de calcul arbitraire, a démontré également que leur taux varie en fonction du sexe, de l'âge et du cycle oestral. Nous avons mis en évidence une évolution physiologique et une différenciation sexuelle des substances considérées qui se manifeste à partir de 6-7 mois d'âge.

7. La nature exacte de ces substances restent encore inconnue.

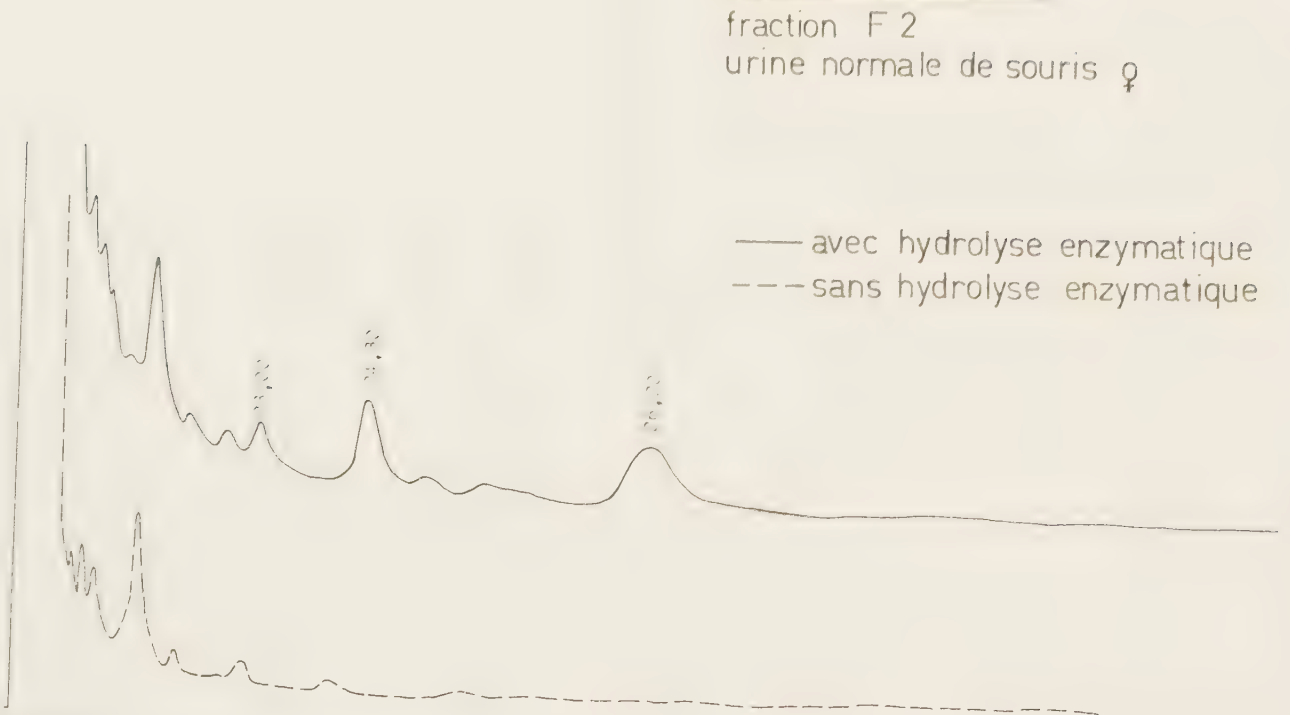


Fig.C.1
Comparaison de chromatogrammes d'urines de souris ♀ mettant en évidence l'effet de l'hydrolyse enzymatique .

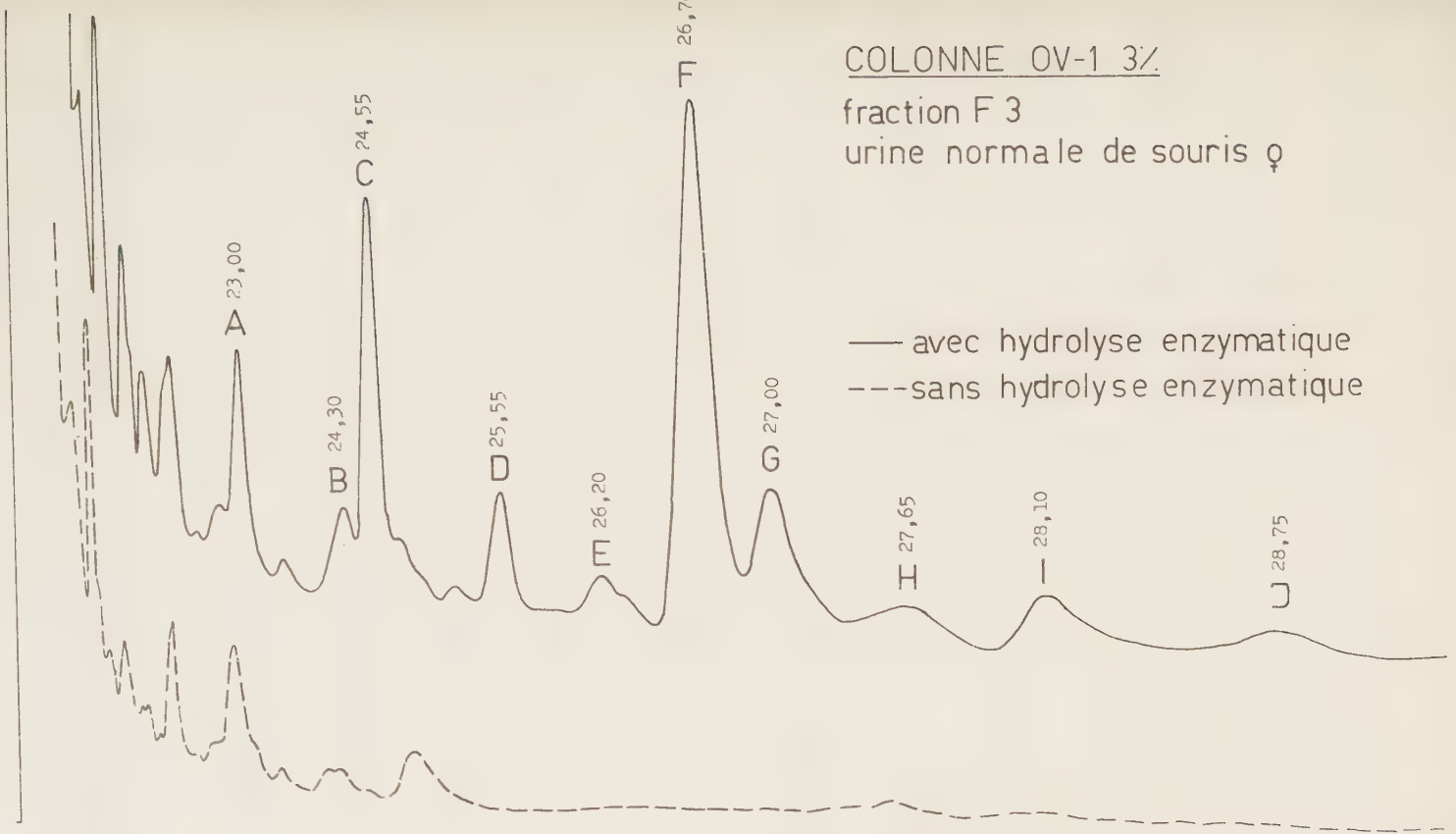


Fig.D.2

Comparaison de chromatogrammes d'urines de souris ♀ mettant en évidence l'effet de l'hydrolyse enzymatique .

REFERENCES

(1) Gray C.H. and Baucharach A.L. : Hormones in Blood. Academic press - London and N.Y. (1967)

(2) Turner C.D. : General Endocrinology. W.B. Saunders Company - Philadelphia - London (1966)

(3) Williams R. : Textbook of Endocrinology. W.B. Saunders Company - Philadelphia - London (1974)

(4) Klyne W. : La chimie des stéroïdes. Gautier-Villars Paris/Collection Enseignement de la chimie (1966)

(5) Tepperman J. : Metabolic and Endocrine Physiology. Year Book Medical Publishers Incorporated - Chicago (1968)

(6) Sunderman F.W. and Sunderman F.W. jr. : Lipid and Seroid Hormones in Clinical Medecine. J.B. Lippincott Company - Philadelphia - Montreal (1960)

(7) Fieser and Fieser : Steroids. Van Nostrand Reinhold Company, N.Y. - Cincinati - Toronto - London - Melbourne (1959)

(8) Berstein S. and Solomon S. : Chemical and Biological Aspects of Steroid Conjugation. Springer-Verlag - Berlin - Heidelberg - N.Y. (1970)

(9) Jayle M.F. : Analyse des stéroïdes hormonaux. Masson et Cie - Paris (1961)

(10) Gustafsson J.A. and Goldman A.S. : Steroid monosulfates in urine from rat pseudohermaphrodite. Endocrinology 90 (1972) 931

(11) Gustafsson J.A. : Steroids in germfree and conventional rat. Steroids monosulfate in urine from female rats. Europ.J.Bioch. 14 (1970) 560

(12) Gustafsson J.A. : Steroids in germfree and conventional rats. Identification of C_{19} and C_{21} steroids in faeces from conventional rats. Europ.J.Bioch. 6 (1968) 248

(13) Gustafsson J.A. and Sjövall J. : Steroids in germfree and conventional rats. Identification of C_{19} in faeces from germfree rats. Europ.J.Bioch. 6 (1968) 227

(14) Gustafsson J.A. : Studies on the metabolism of C_{19} steroids in rats liver. Europ.J.Bioch. 5 (1968) 437

(15) Gustafsson B.E., Gustafsson J.A. and Sjövall J. : Studies in germfree and conventional rats. Europ.J.Bioch. 4 (1968) 568

(16) Snochowski M., Hampl R. and Starka L. : Evidence for DHA excretion in rat urine. Endocrinologia Experimentalis 7 (1973) 133

(17) Rubin B.L. and Chase H.S. jr. : Ovarian secretion rate of progesterone and 20α-hydroxy-4-pregnene-3-one in 57 to 70 days old rats. Steroids 18 (1971) 59

(18) Heitzman R.J. and Hibbitt K.G. : Evaluation by GLC of the urinary steroids of normal and ketonic dairy cows. J.End. 38 (1967) 231

(19) Heitzman R.J. and Thomas G.H. : Evaluation by GLC of the urinary steroids of the pregnant dairy cow. J.End. 33 (1965) 455

(20) Dorfman R. and Gardner W.N. : Metabolism of steroid hormones. The excretion of estrogenic material by ovariectomized mice bearing adrenal tumors. Endocrinology 34 (1944) 421

(21) Karnofski D.A., Nathanson M.D. and Aub J.C. : The urinary excretion of estrogens, 17 CS, creatine and creatinine in high and low mammary tumors strains of mice. Cancer Research - March (1944) 774

(22) Wilson H. : Steroids in the blood and urine of female mice bearing an ACTH-producing pituitary tumor. Endocrinology 62 (1958) 135

(23) Freumann B. and Levine S. : Plasma corticosteroid reponse to stress in four species of wild mice. Endicrinology 84 (1969) 676

(24) Jeannet E. et Neukomm S. : Répartition des substances stéroïdes apparentées aux hormones sexuelles dans l'organisme d'animal sain et cancéreux. Oncologia vol. III, No 2 (1950)

(25) Whitten W.K. : Effects of exterceptive factors on the oestrus cycle of mices. Nature 180 (1957) 1436

Whitten W.K. : Modification of the oestrus cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. J. End. 13 (1956) 299

Whitten W.K. : Modification of the oestrus cycle of the mouse by external stimuli associated with the male change in the oestrus cycle determinated by vaginal smears. J.End. 17 (1958) 307

(26) Neukomm S. : Les 17-céto-stéroïdes tissulaires chez le rat porteur de sarcome chimique. Experientia vol. VII/6 (1951) 230

(27) Henry R. : Méthodes chimiques et physiques récentes de dosage des 17-céto-stéroïdes urinaires et plasmatiques. Ann.Biol.Chim. 23, 1-2 (1965) 211

(28) Metcalf M. : Hydrolysis and decomposition of urinary 17 KS in acid. Steroids 17 (1971) 85

(29) Jayle M.F. et coll. : In : glucuronic acids, free and combined. Ed. Dulton - Academic press - N.y. and London (1966) 533

(30) Burstein S. and Liberman S. : Hydrolysis of ketosteroid hydrogen sulfates by solvolysis procedures. J.Biol.Chem. 233 (1958) 331

(31) Jacobsohn G.M. and Liberman S. : Studies of the chemical cleavage of the urinary glucuronosides of the 17-ketosteroids. J.Biol.Chem. 237 (1962) 1469

(32) Depaoli J.C., Nishizawa E. and Eik-Nes K.B. : Hydrolysis of conjugated 17-ketostroids. J.Clin.End. and mét. 23 (1963) 81

(33) Cawley L.P., Musser B.O., Faucette W., Beckloff S. and Learned H. : Evaluation of hydrolytic products of 17-ketosteroids by means of GLC. Clin.Chem. 11 (1965) 1009

(34) Muehlbaecher C.A. and Smith E.K. : Three hydrolysis method for 17-ketosteroid sulfates compared by colorimetric and GLC analysis. Clin.Chem. 16 (1970) 158

(35) Burstein S., Jacobsohn G.M. and Liberman S. : The cleavage of androsterone β-D-glucopyranosiduronic acid in organic media. J.Amer.Chem.Soc. 82 (1960) 1226

(36) Engel L. : The assay of urinary neutral 17-ketosteroids. Methods of Biochemica Analysis 1 (1954) 479

(37) Goldzieher J.W. and De la Pena A. : The effect of formalin and the furation of acid hydrolysis on free conjugated urinary 17-ketosteroids. Clin.Chem. 14 (1968) 112

(38) Curtius H.Cl. et Muller M. : GLC of 17-ketosteroids and progesterone metabolites of urine : comparison of different methods of hydrolysis. J.Chromatog. 30 (1967) 410

(39) Vestergaard P. and Clausen B. : Hydrolysis of 17-ketosteroids conjugated with a procedure based on simultaneous benzen extraction and acid hydrolysis. Acta End. 39-41 suppl. 63-71 (1961-1962) 35

(40) Vestergaard P. : Hydrolysis of 17-ketosteroids conjugated with β-glucuronidase preparations from liver, bacterial and patella-vulgata. Acta End. 39-41 suppl. 63-71 (1961-1962) 50

(41) Drekter I.J., Heisler A. and Scim G.R. : The modification of urinary steroids. The preparation of pigment free. Extraction and simplified procedure for the estimation of total 17-ketosteroids. J.Clin.End.Mét. 12 (1952) 55

(42) Beale B.N., Bostrom J.L. and Croft D. : The determination of urinary 17-ketosteroids by an improved reaction. J.Clin.Path. 15 (1962) 574

(43) Medical Research Council Comittee and Clinical Endocrinology : A standard method of estimating 17-oxo-steroids and 17-oxogenic steroids. Lancet vol. 1 (1963) 1415

(44) Gray C.H., Brook R.V., Baron D.N. and James V.H.T. : A critical appraisial of a method of estimating urinary 17-ketosteroids and total 17-oxogenic-steroids. Lancet 18 (1969) 124

(45) Wilkins R.B. and Carlson L.D. : Quantitative studies of neutral 17KS in normal subjects. J.Clin.End. and Met. 12 (1952) 647

(46) Masuda M. and Thuline H.C. : An improved method for determination of urinary 17-KS. J.Clin.End. and Met. 13 (1953) 581

(47) Green A.G. : A rapid routine urinary 17-KS technique. Clin.Chim.Acta 7 (1962) 674

(48) Pinkus G. and Pinkus J.L. : Isolation of urinary 17-ketosteroid conjugated by ammonium sulfate precipitation. Clin.Chem. 17 (1971) 37

(49) Klendsho N., Feldstein M. and Prague A. : Determination of 17-kestosteroids in urine. J.Clin.End. and Met. 13 (1953) 922

(50) Peterson R.E. and Pierce Ch.E. : Methodology of urinary 17-ketosteroids. in: réf. (6) 147

(51) Thomas G.H., Allen J.G., Heitzman R.J. and Senciall I.R. : Approaches to the GC analysis of steroid metabolites in the urine of animals.In: chromatographie en phase gazeuse des stéroïdes hormonaux. R.Scholler et M.F. Jayle Dunod - Paris (1967) 249

(52) Feher T., Koref O. and Hollo I. : Paper chromatography of the neutral 17-KS in normal urine. Acta Med.Hung. 18 (1962) 235

(53) Neukomm S. : l'excrétion urinaire des 17-céto-stéroïdes et des oestrogènes chez les individus normaux et cancéreux. Schweizerische Medizinische Wochenschrift 35 (1951) 833

(54) Neukomm S. : Excrétion des 17-céto-stéroïdes chez l'homme normal. Experientia VI/2 (1950) 62

(55) Buehler and al. : Hydrolysis of conjugated of neutral ketosteroids. Proc.Soc.Exper.Biol. and Med. 78 (1951) 3

(56) Kellie A.E. and Wade A.P. : Steroid conjugated. The separation of urinary 17-KS-glucuronids and sulfates and their decomposition in normal individuals. Acta End. 23 (1956) 357

(57) Kellie A.E. and Wade A.P. : The analysis of urinary oxo-steroids by gradient elution. Bioch.J. 66 (1957) 196

(58) Grand and Beal : in : Rec.Prog.Hormone Res. Academic press - N.Y. (1950) 307

(59) Cohen S.L. and Oneson I.B. : J.Biol.Chem. 204 (1953) 245

(60) Eriksson H. and Gustafsson A.A. : Excretion of steroid hormones in adults. Steroids in urine from adults. Clin. Chim. 41 (1972) 79

(61) Eriksson H. : Excretion of steroid hormones in adults (C_{19} and C_{21} steroids in faces from pregnant wommen). Europ.J.Bioch. 12 (1970) 520

(62) Gustafsson J.A. : Steroids in Germfree and Conventional Rats. Eur.J.Bioch. 14 (1970) 560

(63) Berrette Ch.R. and Mc Neil C. : The quantitation of major 17-KS fractions by GLC. Clin.Chem. 12 (1966) 399

(64) Metthijssen Ch. and Goldzieher J.W. : Analysis of total, grouped and individual urinary 17-KS : A critical evaluation. Acta.End. 681 (1971) 311

(65) Thomas B.S., Bulbrook R.D., Durant J.A, Miller H. and Ross O. : A rapid method for the estimation of urine 11-deoxy-17-oxo-steroids and its use in the management of patients with breast cancer. Clin.Bioch. 2 (1969) 311

(66) Scholler R., Del Pozo D., Nahoul K. et Salvador P. : Détermination du pregnanediol urinaire en dehors de la grossesse. In : Chromatographie en phase gazeuse des stéroïdes hormonaux. R. Scholler et M.F. Jayle - Dunod - Paris (1967) 267

(67) Henry R. et Thevenet M. : Bull.Soc.Chim.Biol. 34 (1952) 886

(68) Desgres J., Begue R. J. et Padieu P. : Analyse qualitative et quantitative des 17-oxo-stéroïdes et des 20-Hydroxy-21-desoxystéroïdes urinaires par CPG. Clin.Chim.Acta 52 (1974) 381

(69) Kamil I.A., Smith J.W. and Willams R.T. : Biochem.J. 54 (1953) 390

(70) Edwards R.W.H., Kellie A.E. and Wade : Mem.Soc.End. 2 (1953) 53

(71) Bradlow L. : Excretion of steroids conjugated with a neutral resin. Steroids 11 (1968) 265

(72) Ruchelman M.W. and Cole V.W. : Analysis of urinary 17-KS by GLC. Clin.Chem. 12 (1966) 771

(73) Sparagana M. , Keutmann E.M. and Mason W.B. : Quantitative determination of invividual $C_{19}O_2$ and $C_{19}O_3$ urinary 17-KS by GC. Anal.Chem. 35/9 (1963) 1231

(74) Gustafsson B.E., Gustafsson J.A. and Sjövall J. : Steroids in germfree and conventional rats. Europ.J.Bioch. 4 (1968) 574

(75) Girard A. and Sandu L. : Helv.Chim.Acta 19 (1936) 1095
In : (9) p. 88 tom. I

(76) Kirschner M.A. and Lipsette M.B. : The analysis of urinary steroids using GLC. Steroids 3 (1964) 277

(77) Pinelli A. and Formento M.L. : A precise and sensitive method for the analysis of steroids in small urine samples by TLC and GLC. J.Chromatog. 68 (1972) 67

(78) Gairard A., Fouquin N. et Caillard C. : Fractionnement des 17-oxo-stéroïdes urinaires sur CCM de silice, valeurs normales chez les adultes. Ann.Biol.Clin. 26/10-12 (1968) 1159

(79) Leluan G. et Gairard A. : Utilisation de la CCM de silice pour la séparation et l'évaluation des 17-oxo-stéroïdes de la série de l'androstane. Ann.Biol.Clin. 25 (1967) 859

(80) Brockmann H. und Schodder H. : Aluminiumoxyd mit abgestuften adsorptionsvermögen zur chromatographischen adsorption. Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft 74 (1941) 73

(81) Vihko R., Jäune O., Sjövall K. and Sjövall J. : Determination of plasma solvolysable steroids. In : Chromatographie en phase gazeuze des stéroïdes hormonaux. R.Scholler et M.F. Jayle - Dunod - Paris (1967) p. 383

(82) France J.T., Rivera R., Mc Niven N. and Dorfman R. : Determination of androsterone, etiocholanolone and DHA in urine by GLC. Steroids 5 (1965) 687

(83) Rivera R., Dorfman R.I., and Forchielli E. : A modified method for the analysis of urinary 17-KS, pregnanediol and pregnanetriol by GLC in normal subjects and subjects with various desorders. Acta End. 54 (1967) 37

(84) Zimmermann W.Z. : Ein Farbreaktion des Sexualhormone und ihre Unwendung zur quantitativen colorimetrischen Bestimmung. Z. Physiol.Chem. 233 (1935) 257

(85) Zimmermann W.Z. : Physiol.Chem. 245 (1936) 47. In : (réf: 36)

(86) Marlow H.W. : Groups involved in the Zimmermann and Kober reactions. J.Biol.Chem. 183 (1950) 167

(87) Callow R.K. : The chemical estimation of urinary 17-KS. J.End. 5 : IXVII (1946-1948)

(88) Holtrof A.F. and Koch F.S. : The colorimetric estimation of 17-KS and their application to urine extracts. J.Biol. Chem. 135 (1940) 377

(89) Wilson H. and Canter P. : Stabilization in the alcoholic potassium hydroxyd in colorimetric 17-KS determination. End. 41 (1947) 417

(90) Allen W.M. : A simple method for analyzing complicated absorption curves of use in the colorimetric determination of urinary steroids. J.Clin.End. 10 (1950) 71

(91) James V.H.T. and Jong M. : The use of teramethylammonium hydroxyd in the Zimmermann reaction. J.Clin.Path. 14 (1961) 425

Cahen R.L. and Salter W.I. : Urinary 17-KS in metabolism. I. Standardized chemical estimation. J.Biol.Chem. 152 (1944) 489

Autunes L. : Interfering chromogens in the 17-KS determination. J.Clin.End. 16 (1956) 1125

Munson P.L. and Kenny A.D. : Colorimetric analysis method for neutral 17-KS of urine. Rec.Prog.Hormone.Res. 9 (1954) 135

Corcker C.S., Norymberski J.K. and Thow R. : Some aspects of the Zimmermann reaction. Bioch.J. 83 (1962) 583

Pincus G. : New color reaction for certain urinary 17-ketosteroids. Endocrinology 32 (1932) 176

Davis J.G. : Separation of free and conjugated 11-deoxy-17-oxo-steroids by TLC. Anal.Bioch. 15 (1966) 184

Cerny V., Joska J. and Labler L. : Application of TLC without binder for rapid analytical and preparative separation of steroids. Collection Czechoslov.Chem.Commun. pent LVIII, 26 (1961) 1646

Lisboa B.P. : TLC of 4Δ-oxo-steroids of the androstane series. J.Chromatog. 19 (1965) 81

Starka L., Sulcova J., Riedlova J. and Adamec O. : Fractionation of 17-KS by TLC on alumina. Clin.Chim.Acta 9 (1964) 168

Mattehews J. : Color reagent for steroids in TLC. Bioch. Biophys.Acta 69 (1963) 163

Dyer W.G., Gould J.P., Maistrelli N.A., Peng T.C. and Ofner P. : TLC of some C_{19} steroids. Steroids 1 (1963) 271

Feher T. : Application of TLC on purification, separation and quantitative determination of steroid metabolites. Mikrochimica Acta 1 (1965) 105

Vandenheuvel F.A. : Precise ultramicro determination of steroid hormones by combined TLC and GLC analysis. J.Amer. Oil.Chem.Soc. 42 (1965) 283

(105) Mikac-Devis D., Misic M. and Stankovic H. : Quantitative method for the determination of 17-oxo-steroid fractions by TLC. Z.Klin.Chem.U.Klin.Biochem. 8 jg, s. 361-363 (1970)

(106) Venden Bulcke A. : Chromatographie de partage en couche mince. Quelques applications à l'identification des stéroïdes neutres ou phénoliques ainsi que des tetracycline. Journal de Pharmacie de Belgique. 24 (1969) 439

(107) Lisboa B.P. : Application of TLC to the steroids of the androstane series. J.Chromatog. 13 (1964) 391

(108) Hamman B.L. and Martin M.M. : Separation of six urinary 17-KS by two dimentional TLC. Control values and reponses to ACTH. J.Clin.End.Met. 24 (1964) 1195

(109) Martin A.T. and James J.P. : Bioch.J.Proc. 48 VII (1951)

(110) James H.J.P. and Martin A.T. : Analyst 77 (1952) 915

(111) Völlmin J.A. : High resolution GC of urinary steroids on glass capillary columns. Clin.Chim.Acta 34 (1971) 207

(112) Völlmin J.A. and Zagalak M. : Separation and identification of steroids on glass capillary columns. (communication personnelle)

(113) Gardiner W.L., Brook C.J.W., Horning E.C. and Hill R.M. Urinary steroids pattern of the human newborn infant. Bioch.Biophys.Acta 130 (1966) 278

(114) Gardiner W.L. and Horning E.C. : GLC separation of C_{19} and C_{21} human urinary steroids by a new procedure. Bioch Biophys.Acta 115 (1966) 524

(115) Horning E.C., Horning M.G., Ikekawa N., Chambaz E.M., Jaakonuraki P.I. and Brooks C.J.W. : Studies of analytical separation of human steroids and steroid glucuronides. J.Gas Chromatog. 5 (1967) 283

(116) Feher T. and Bodroji L. : Correlation between the chemical structure and retention behaviour of C_{19} steroids. J.Chromatog. 71 (1972) 17

(117) Völlmin J.A. : Séparation par chromatographie en phase gazeuse de stéroïdes sur colonne capillaire en verre Chromatographia 3 (1970) 233

(118) Hiscoc A., Mathieson D.W. and Penett R.H. : GLC of keto and hydroxyandrostanes. J.Chromatog. 81 (1973) 144

(119) Chambaz E.M. and Horning E.C. : Conversion of steroids to trimethylsilyl derivatives for gas phase analytical studies. Analy.Bioch. 30 (1969) 7

(120) Berthou F., Bardou L. and Floch H.H. : Separation of urinary androstanediol and pregnanediol isomers by a combined gas liquid chromatography and thin layer chromatography method. J.Chromatog. 93 (1974) 1

(121) Moore J.W. : A rapid method for the analysis of enzyme hydrolysable 11-deoxy-17-oxo-steroids in urine. Clin. chim.Acta 39 (1972) 532

(122) Tranchant J. : Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Masson - Paris (1968)

(123) Vandenheuvel W.J.A. and Horning E.C. : A study of retention-time relationships en GC in terms of the structure of steroids.

(124) Hamilton R.J., Vandenheuvel W.J.A. and Horning E.C. : An extension of the "steroid numbers" concept to relationships between the structure of steroids and their GC retention-times observed with selective phases. Bioch. Biophys.Acta 70 (1963) 679

(125) Erba Carlo : Recueil de techniques d'analyse des stéroïdes par chromatographie en phase gazeuse. Carlo Erba, divisione apparecchi scientifici - Milano

(126) Scholler R. et Dehennin L. : Quelques problèmes pratiques posés par l'analyse quantitative en chromatographie en phase gazeuse. In : Chromatographie en phase gazeuse des steroïdes hormonaux. R.Scholler et M.F. Jayle. Dunod Paris (1967) p. 3

(127) Shackleton C.H.L., Sjövall J. and Wisen O. : A simple method for the extraction of steroids from urine. Clin. Chim.Acta 27 (1970) 354

(128) Eriksson H. and Gustafsson J.A. : Excretion of steroid hormones in adults. Steroids in urine from adults. Clin. Chim.Acta 41 (1972) 79

(129) Viinikka L. and Jäume J. : Urinary excretion of neutral steroid glucuronides with reference to the menstrual cycle. Clin.Chim.Acta 49 (1973) 277

(130) Jaussette M.E. : Effective adsorption of DHA-sulfate and other 17-KS conjugates from urine by amberlite. Clin. Biochem. 4 (1971) 287

(131) Charollais E.J., Ponse K. et Jayle M.F. : Méthode de dosage des 17-céto-stéroïdes dans l'urine de cobaye. Application au cycle oestral. Ann.Endo. Paris 18 (1957) 109

(132) Baulieu E.E., Michaud P. et Jayle M.F. : In : réf. (9) tome I, p. 73

(133) Tanner J. M. and Gupta D. : J.End. 41 (1968) 157. In : réf. (134)

(134) Trafford D.J.H. and Makin H.L.D. : Rapid qualitative fractionation of the major 17-oxo-steroids and 17-oxogenic-steroids. Clin.Chim.Acta 40 (1972) 421

(135) Eik-Nes K.E. and Horning E.C. : Gas phase chromatography of steroids. Monographs of endocrinology - Springer - Verlag - Berlin-Heidelberg - N.Y. (1968)

(136) Stahl E. : Thin-layer chromatography. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New-York. (1969)

(137) Jenny M. : Les relations hypophyso-surrénaliennes chez l'homme. Acta-Clinica Documenta Geigy No 10 (1970) Basel - Suisse

(138) Tables scientifiques : Ciba-Geigy (1972) Basel - Suisse

(139) Gurub H. and Gilbert J. : A modified method for the estimation of p20H, p30H and seven common 17-kerosteroids in urine by GLC. Steroids 22 3 (1973) 311

(140) Greenstein J.P. : Biochemistry of cancer. Academic press inc. Publishers New-York, N.Y. (1954)

(141) Harper H. : Précis de biochimie. Les presses de l'université Laval. Québec, Librairie Armand Colin - Paris (196

(142) Selkurt E. : Physiology. J. & A. Churchill Ltd. 104 Gloucester Place, London W.1 (1966)

(143) Kasai H., Musutani S. and Matsumotu K. : Detection of ^{3}H-5α-androstane-3α, 17β-diol and ^{3}H-17β-hydroxy-5α-androstane-3-one in mouse testes following administration of ^{3}H-testosterone. Acta Endocrinologica 74 (1973) 177

(144) Appelgreen L.E. : Autoradiographic studies of labelled 5α-dihydroxytestosterone in mice. Steroids Lipids Res. 3 (1972) 286

(145) Appelgreen L.E. : The distribution of labelled androstanedione in mice. Steroidologia 2 (1971) 87-99

(146) Arimasa N. and Kochachian Ch. : Epitestosterone and 5α-androstane-3-α, 17β-diol : the characteristic metabolites of androst-4-ene-3, 17-dione produced by mouse kidney in vitro. Endocrinology, vol.92, No 1 (1973) 72